ANALYSE DER EIGENSCHAFTEN PORENBILDENDER ANTIBIOTIKA UND PROTEINE IN PLANAREN LIPIDMEMBRANEN IM BEREICH DER TEMPERATUR DER LIPIDPHASENUMWANDLUNG

Dissertation
zur Erlangung des Grades
eines Doktors der Naturwissenschaften
der Abteilung für Biologie
an der Ruhr-Universität Bochum

vorgelegt von
Wolfgang Hanke

Bochum 1981

Diese Arbeit entstand im Rahmen des
Sonderforschungsbereiches 114 „Bionach"

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41544708_0037

ANALYSE DER EIGENSCHAFTEN PORENBILDENDER ANTIBIOTIKA UND PROTEINE IN PLANAREN LIPIDMEMBRANEN IM BEREICH DER TEMPERATUR DER LIPIDPHASENUMWANDLUNG

Dissertation
zur Erlangung des Grades
eines Doktors der Naturwissenschaften
der Abteilung für Biologie
an der Ruhr-Universität Bochum

vorgelegt von
Wolfgang Hanke

Bochum 1981

Diese Arbeit entstand im Rahmen des
Sonderforschungsbereiches 114 „Bionach"

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.	Einleitung	1
1.1	Biologische Membranen, künstliche Lipidmembranen	1
1.2	Der physikalische Zustand biologischer Membranen und künstlicher Lipidmembranen	6
1.3	Fusion bei biologischen und künstlichen Membransystemen	7
1.4	Transportsysteme in biologischen Membranen und künstlichen Lipidmembranen	1o
1.4.1	Carrier	1o
1.4.2	Porenbildner	11
1.4.3	Kanäle in biologischen Membranen ...	15
1.5	Problemstellung	15
2.	Materialien und Methoden	18
2.1	Synthetische Lipide	18
2.2	Antibiotika	24
2.3	Chemikalien	24
2.4	Biologische Präparationen	25
2.5	Methoden der Herstellung planarer Bilayer	28
2.6	Aufbau der Meßapparatur	31
2.6.1	Gesamtübersicht	31
2.6.2	Mechanischer Aufbau	34
2.6.3	Elektronischer Aufbau	4o
2.7	Vorzeichenkonvention	45
3.	Ergebnisse	46
3.1	Eigenschaften planarer Bilayer im Bereich der Temperatur der Lipidphasenumwandlung	46

UNIV. LEIDEN BIBL.

		Seite
3.1.1	Reine planare Bilayer	46
3.1.2	Carriertransport	5o
3.1.3	Porentransport	52
3.1.3.1	Gramicidin	52
3.1.3.1.a	Vielporensystem	53
3.1.3.1.b	Einzelporensystem	53
3.1.3.2	Alamethicin	61
3.1.3.2.a	Vielporensystem	61
3.1.3.2.b	Einzelporensystem.....	66
3.1.3.2.c	Das Auftreten eines zweiten Porentyps	74
3.2	Fusion von proteinbeladenen Vesikeln mit planaren Bilayern im Bereich $T \leqslant T_c$	81
3.2.1	Acetylcholinrezeptor - Membranfragmente	85
3.2.2	Acetylcholinrezeptor - affinitätschromatographisch gereinigt	1oo
3.2.3	Vesikel aus Cilienfragmenten	1o4
4.	Diskussion	112
4.1	Reine Lipidmembranen	112
4.2	Transportsysteme	114
4.2.1	Carrier	115
4.2.2	Porenbildende Antibiotika	116
4.2.3	Rekonstituierte Kanalproteine	123
4.3	Auswirkungen der Ergebnisse	128
4.3.1	Rekonstitution biologischer Kanäle .	128
4.3.2	Modellvorstellungen zum Aufbau biologischer Membranen	13o
5.	Zusammenfassung	132

Seite

6.	Anhang	134
6.1	Gramicidin	134
6.2	Alamethicin	137
6.3	Der durch Acetylcholin aktivierbare Kanal	142
6.4	Der Ca^{++} - Kanal in der Cilienmembran von Paramecien	145
	Literaturverzeichnis	147

Liste der verwendeten Abkürzungen und Symbole

ACh-akt.-Kanal	Durch Acetylcholin aktivierbarer Kanal
AChR	Acetylcholinrezeptorprotein
ACh	Acetylcholin
Carb	Carbamylcholin
Sub	Suberyldicholin
Hexam	Hexamethonium
Gram	Gramicidin
Al-3o	Alamethicin R_F 3o Komponente
Al-5o	Alamethicin R_F 5o Komponente
1,2-DPPC	1-α-Dipalmitoyl-Phosphatidylcholin
1,3-SMPC	1,3-Stearoyl-Myristoyl-Phosphatidylcholin
1,2-HTPC	1,2-Hexadecyl-Tetradecyl-Phosphatidylcholin
DSC	Differential-Scanning-Calorimetrie
π^M	Spreitungsdruck eines Monolayers
π^B	Interner Druck eines Bilayers
A	Fläche pro Molekül
IC	Operationsverstärker
U	Spannung
I	Strom
C	Kapazität
R	Widerstand
λ	Leitfähigkeit
Λ	Leitwert
T	Temperatur
T_c	Temperatur der Hauptphasenumwandlung eines Lipids
t	Zeit
τ	Zeitkonstante, mittlere Lebensdauer
f	Frequenz
ν	Niveauzahl einer Alamethicinpore
E_A	Aktivierungsenergie
E_{Alk}	Selektivitätspotential
P	Permeabilitätskoeffizient
A	Relaxatationsamplitude
C	Konzentration

1. Einleitung

1.1 Biologische Membranen, künstliche Lipidmembranen

Die Zellmembran stellt für biologische Organismen eine Grundvoraussetzung ihrer Existenz dar. Sie trennt das Innere einer Zelle vom Außenmedium und stellt in dieser Funktion eine Barriere für den Stofftransport vom Außenmedium zum Zellinneren und umgekehrt dar. Der Transport aller von einer Zelle benötigten Stoffe muß selektiv über die Membran in das Zellinnere erfolgen. Außerdem müssen die Endprodukte des Stoffwechsels selektiv aus dem Zellinneren entfernt werden. Die Membran von Nervenzellen nimmt zusätzlich die Funktionen der Auslösung und Weiterleitung von Nervenimpulsen wahr (1).

Indirekte Messungen führten schon relativ frühzeitig zu dem Modell einer dreischichtigen Membran. Dies bestand aus einer doppelt-molekularen Lipidschicht (2), der beidseitig je eine Schicht von Proteinen angelagert war (3). Elektronenmikroskopische Untersuchungen durch Robertson, 1957, stützten diese Hypothese (4). Bild 1.1 zeigt ein Modell dieser sogenannten 'unit-membrane', in dem die Kohlenwasserstoffketten der Lipide zueinander gerichtet sind und die polaren Köpfe zu den Proteinschichten zeigen. Dieses erste einfache Modell reichte aber nicht aus, alle in der Folgezeit beobachteten Vorgänge an biologischen Membranen zu erklären. Es entstand das Modell der 'fluid-mosaic-membrane' oder Polymermembran von Singer und Nicolson, 1972 (6), das in seiner generellen Struktur auch gegenwärtig gültig zu sein scheint. Bild 1.2 zeigt schematisch dieses Membranmodell. Es besteht aus einer tragenden Lipiddoppelschicht, in die ein Teil der Proteine, die sog. integralen Proteine, eingebaut und der der andere Teil der Proteine, die sog. peripheren Proteine, angelagert sind. Alle Proteine sind ebenso wie die Lipide lateral beweglich.

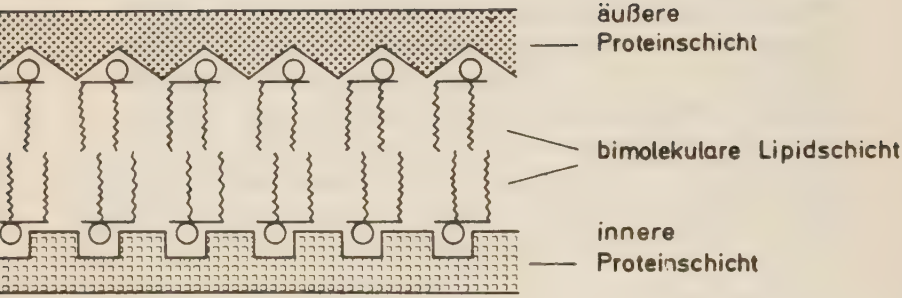


Bild 1.1

Schematische Darstellung des Modells der 'unit-membrane' mit einer doppelten Lipidschicht als tragendem Gerüst und Proteinschichten unterschiedlicher Beschaffenheit auf beiden Seiten. (aus (5))

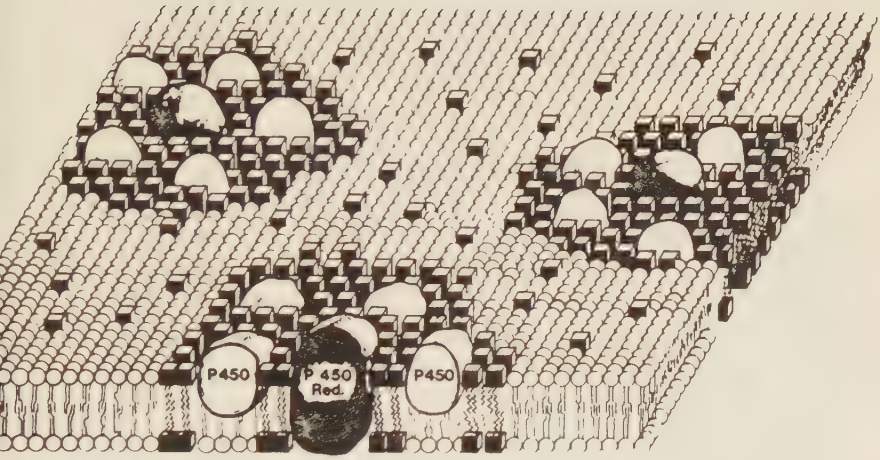


Bild 1.2

Schematische Darstellung des Modells der 'fluid mosaic membrane'. Die Zellmembran setzt sich zusammen aus Bereichen verschiedener Lipid- und Proteinzusammensetzung, die gegeneinander und in sich lateral beweglich sind. (aus (7))

Integrale Proteine, die die Membran überspannen, können die Funktion des Teilchentransports über die Membran wahrnehmen, der wegen der hydrophoben Lipidschicht der Membran für hydrophile Stoffe nicht in ausreichendem Maße möglich ist. Über den detaillierten Aufbau biologischer Membranen, insbesondere über ihren lokalen physikalischen Zustand, ist jedoch immer noch sehr wenig bekannt.

Gestützt wurden diese Modelle biologischer Membranen durch die ersten gelungenen Versuche, künstliche Membranen aus reinem Lipid, sog. planare Bilayer, herzustellen (8). Diese planaren Bilayer stellen das einfachste, auf das tragende Lipidgerüst reduzierte Modell einer biologischen Membran dar und enthalten daher keine Transportsysteme und Proteine. Ein solcher planarer Bilayer kann nur in wässriger Umgebung existieren und stellt hier eine Barriere für den Transport von Ionen dar (9). Daraus folgt die Vermutung, daß in die Lipidschicht eingelagerte Transportsysteme, hierfür kommen in erster Linie die integralen Proteine in Frage, den Stofftransport über die Membran ermöglichen. Das System des planaren Bilayers gestattet es nun, einzelne definierte Transportsysteme einzubauen und gezielt elektrochemisch zu untersuchen. Messungen an Bilayermembranen mit eingebauten Transportsystemen haben erheblich zum Verständnis von Transportprozessen über biologische Membranen beigetragen.

Lipide bilden einen Hauptbestandteil bei biologischen Zellmembranen. Sie gehören zu den amphiphilen Substanzen, d.h. man kann einen hydrophilen und einen hydrophoben Teil des Moleküls unterscheiden. Daher bilden Lipide in wässriger Umgebung lamellare Schichten aus. Biologisch interessant sind vor allem Phospholipide und Cholesterin, die auch im wesentlichen zur Herstellung planarer Bilayer dienen.

Allen Phospholipiden sind das Glyceringerüst und die Phosphatgruppe gemeinsam. Einen weiteren Bestandteil der Moleküle dieser Substanzklasse bilden zwei Kohlenwasserstoffketten. Die Phosphatgruppe befindet sich entweder auf einer der Außenpositionen des Glyceringerüsts, α -Lipide, oder in Mittelstellung, β -Lipide. β -Lipide sind bisher wenig untersucht worden und kommen in biologischen Membranen fast nicht vor (1o). Die beiden anderen Positionen des Glyceringerüsts sind in der Regel mit zwei Fettsäuren verestert. Die chemische Umsetzung kann auch mit den entsprechenden Alkoholen erfolgen. Es entstehen die auch natürlich vorkommenden Ätherlipide. Ätherlipide zeichnen sich durch ihre höhere Stabilität gegen Hydrolyse aus und werden daher für Bilayer-Versuche unter extremen pH-Bedingungen verwendet. Die Kohlenwasserstoffketten der Lipide können gleich lang oder von verschiedener Länge sein. Außerdem können eine oder beide Ketten eine oder mehrere Mehrfachbindungen enthalten. Man spricht von gesättigten bzw. ungesättigten Lipiden und von gleich- oder gemischtkettigen Lipiden.

Für Bilayerversuche wurden bisher meist Lipide mit ungesättigten Kohlenwasserstoffketten verwendet. Ihre Phasenumwandlungstemperatur liegt so niedrig, daß sich bei Raumtemperatur (21-23°C) Membranen bilden lassen, deren Kohlenwasserstoffketten in fluidem Zustand sind. Die Phasenumwandlungstemperaturen von Lipiden lassen sich mit Hilfe der Differential-Thermoanalyse (DSC) bestimmen (11). Weiterhin dienen Messungen an Lipidmonoschichten der Untersuchung des Phasenverhaltens von Lipiden (12,13). Die Daten von Bilayer- und Monolayer-Systemen konnten bisher jedoch nicht eindeutig miteinander korreliert werden.

1.2 Der physikalische Zustand biologischer Membranen und künstlicher Lipidmembranen

Untersucht man die Abhängigkeit experimentell erfaßbarer Parameter von biologischen Membranen und von Lipid-Wasser-Systemen in Abhängigkeit von der Temperatur, so stellt man fest, daß einige Parameter sich bei definierten Temperaturen unstetig, sprungartig, ändern (14-17). An reinen Lipid-Wasser-Systemen werden durch DSC-Messungen Maxima der spezifischen Wärme bei definierten Temperaturen gefunden (11). Die Temperatur des absoluten Maximums wurde als Hauptumwandlungstemperatur, die der bei niedrigeren Temperaturen liegenden lokalen Maxima wurden als Vorumwandlungstemperaturen bezeichnet.

Spin-Label- (7) und NMR-Messungen (18-2o) führten dazu, die Hauptumwandlung als einen Effekt der Erstarrung bzw. Fluidisierung der Kohlenwasserstoffketten anzusehen und die Vorumwandlung, soweit vorhanden, als einen Effekt der Ordnung der Kopfgruppen oder als eine Strukturumwandlung. Obwohl physikalische Messungen in ausreichendem Maß möglich und die Vorgänge zumindest am Einkomponentensystem auch theoretisch gut verstanden sind (21), blieben die Messungen von Phasenübergangsphänomenen bei den aus mehreren Komponenten bestehenden biologischen Membranen immer schwierig. Erste qualitative Messungen an planaren Lipidmembranen mit eingelagerten Transportsystemen im Bereich der Temperatur einer Lipidphasenumwandlung konnten bisher nicht bestätigt werden (22).

Das Verständnis der Vorgänge wird dadurch erschwert, daß im Bereich der Phasenumwandlung bereits bei einem Einkomponentensystem zwei Lipidphasen (fest-flüssig) auftreten. Bei Mehrkomponentensystemen kann die Anzahl von Lipidphasen entsprechend größer sein. Biologische Membranen entziehen sich mit ihrer Vielzahl von Lipid-und Proteinkomponenten bisher jeder vollständigen Beschreibung.

Modelluntersuchungen wurden unter anderem von Sackmann und Mitarbeitern unter Verwendung des Pyren als Spinlabel durchgeführt. So führte z.B. Polylysin zu lateralen Phasentrennungen in einer Membran aus Phosphatidylcholin und Phosphatidsäure (122,123).

1.3 Fusion bei biologischen und künstlichen Membransystemen

Die Fusion von Membranvesikeln mit Zellmembranen spielt bei vielen biologischen Prozessen eine wichtige Rolle. So wird in Zellen durch Endozytose, d.h. durch Verschmelzung mit extrazellulären Vesikeln, Material aufgenommen und durch den inversen Prozeß, die Exozytose, Material nach außen abgegeben (23). Eine wesentliche Rolle spielt die Fusion von intrazellulären Vesikeln mit der präsynaptischen Axonmembran bei der Freisetzung von Acetylcholin in den synaptischen Spalt bei der Reizübertragung.

Die Fusion ganzer Zellen miteinander ist unter den verschiedensten Bedingungen möglich. So können Zellen spontan miteinander fusionieren (24), ebenso wie eine induzierte Zellfusion möglich ist (25-28). Beschrieben wird in der Literatur auch die Fusion von Lipidvesikeln mit kultivierten Zellen (29).

Die Fusion künstlicher Lipidmembranen ist untersucht worden. Lösungsmittelfreie Vesikel fusionieren spontan miteinander unter zwei verschiedenen Bedingungen:

1. In Anwesenheit negativ geladener Lipide bei Mehrkomponentensystemen und millimolaren Ca^{++}-Konzentrationen in der Lösung (3o,31).
2. Im Bereich der Temperatur der Phasenumwandlung des reinen Lipids (T_c) bei Einkomponentensystemen (32,33).

Die Fusion von Vesikeln mit planaren Bilayern wurde unter den Bedingungen (1.) nachgewiesen und untersucht. Die Anwesenheit eines osmotischen Gradienten über der Membran war hierbei zusätzlich erforderlich (34,35). Eine Fusion von Vesikeln mit reinen planaren Bilayern (Bed. 2) wurde bisher noch nicht nachgewiesen.

Das oben Gesagte ist im folgenden Schema kurz zusammengefaßt:

	Fusion Vesikel-Vesikel	Fusion Vesikel-planarer Bilayer
1.	Mehrkomponentensystem mit negativ geladenen Lipiden $\geq$ 1 mM Ca^{++} $T > T_c$, für jede einzelne Komponente	Mehrkomponentensystem mit negativ geladenen Lipiden $\geq$ 1 mM Ca^{++} $T > T_c$ für jede einzelne Komponente osmotischer Gradient
2.	Einkomponentensystem $T \leq T_c$	

Miller et al. zeigten, daß nach der Fusion von Vesikeln mit planaren Bilayern aus Phosphatidylethanolamin und Phosphatidylserin typische Stromschwankungen auftraten, sofern die Vesikel Ionentransportsysteme, in diesem Fall porenbildende Proteine, enthielten (34). In Bild 1.3 ist die Leitfähigkeit einer künstlichen Lipidmembran als Funktion der Zeit aufgezeigt. Jeder der schnellen Spikes entsteht bei der Fusion eines Vesikels mit der

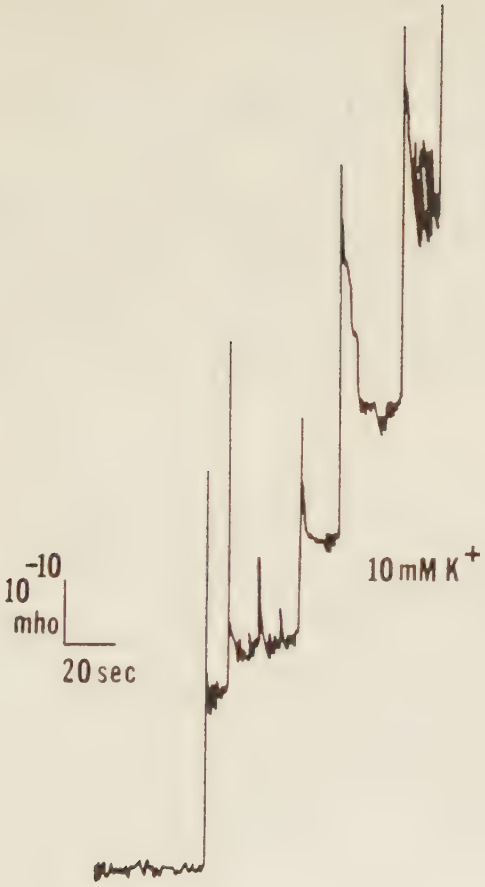


Bild 1.3

Beispiel von Fusionsereignissen von Vesikeln mit planaren Bilayern. Die Temperatur liegt oberhalb der Umwandlungstemperatur flüssig/kristallin-kristallin der einzelnen Lipidkomponenten. Im Bilayer sind negativ geladene Lipide, in diesem Fall Phosphatidylserin enthalten. Die Vesikel stellen eine Fragmentpräparation aus dem sarcoplasmatischer Reticulum dar. Jeder der hohen Spikes entspricht einem Fusionsereignis. Dabei werden Transportproteine in den Bilayer eingebaut. Dies schlägt sich jeweils in einer Leitfähigkeitserhöhung nieder. (aus (34))

Membran, entsprechend einem großen Leck durch die Störung der Membranstruktur beim Einbau des Vesikels. Die Erhöhung der mittleren Leitfähigkeit nach jeder Fusion bedeutet, daß jedesmal mehrere Poren in die Membran eingebaut werden.

In allen Fällen werden Strukturdefekte in den Bilayern als Ursache für die Fusion angenommen, die durch Phasengrenzen oder Versetzungen bei der Kristallisation hervorgerufen werden können. Es ist bekannt, daß zweiwertige Kationen die Phasenübergangstemperatur negativ geladener Lipide durch Ladungsneutralisation verändern (36).

1.4 Transportsysteme in biologischen Membranen und künstlichen Lipidmembranen

Wie bereits erwähnt, stellen die in die 'fluid-mosaic-membrane' eingebauten Proteine mögliche Transportsysteme über die Membran dar. Da bei planaren Bilayern einfache elektrochemische Messungen des über die Membran stattfindenden Ionentransports möglich sind, liegt es nahe, in diese Transportproteine einzubauen. Der Funktion nach werden diese Proteine in Carrier und Porenbildner unterteilt. Sie sollen im folgenden in ihren grundsätzlichen Eigenschaften kurz beschrieben werden.

1.4.1 Carrier

Als Carrier bezeichnet man Moleküle, die an der Grenzfläche Membran-wässrige Lösung ein Ion durch Komplexbildung aufnehmen und in der Lage sind, dieses aufgrund des hydrophoben Charakters des Ion-Carrierkomplexes über die Lipidbarriere zu transportieren, und auf der

anderen Seite durch Dissoziation das Ion wieder freisetzen. Der Carrier kehrt allein auf die Ausgangsseite zurück und der Zyklus beginnt erneut. In Bild 1.4 ist das Prinzip des Carriertransports dargestellt. Ein Carriertransport ist für Ionen und neutrale Moleküle denkbar. Es ist auch ein anderer als der in Bild 1.4 dargestellte Mechanismus denkbar, z.B. durch Rotation eines Moleküls. Eine Reihe von Ionen-Carriern wurde in planaren Membranen genau untersucht, z.B. Valinomycin (38), Nonactin (39) und Enniatin (4o). Für diese Moleküle konnten Transportraten, Geschwindigkeitskonstanten und Selektivität experimentell bestimmt werden.

1.4.2 Porenbildner

Es können jedoch bei weitem nicht alle Transportvorgänge an Membranen durch einen Carriertransport erklärt werden. Dies führte zur Annahme von porenbildenden Proteinen, die die Membran überspannen und einen hydrophilen Kanal bilden, dessen Inneres den Durchtritt von Ionen ermöglicht (1). Lange Zeit blieb der direkte Nachweis einzelner Kanäle in biologischen Membranen unmöglich. Jedoch gelangen die Isolierung und Synthese einiger einfacher Polypeptide, die sich nach Zugabe in die Badlösung in planare Bilayer einbauten und dort Poren bildeten. Die Porenbildung des Gramicidin erfolgt durch Dimerisierung von im Inneren des Bilayers lateral diffundierenden Gramicidinmonomeren (41-45). Es sind auch andere Porenbildungsmechanismen denkbar, von denen einige in Bild 1.5 schematisch dargestellt sind. Die folgenden Porenbildner wurden untersucht: Monazomycin (46), EIM (47), Alamethicin (48-56) und Strukturanaloga desselben (57-6o). Über die Versuche an planaren Bilayern hinaus

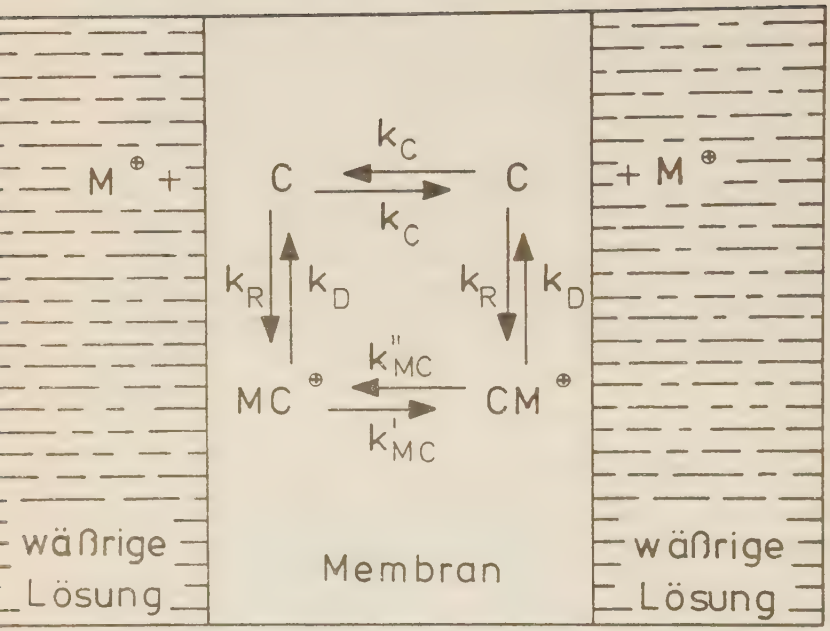


Bild 1.4

Schematische Darstellung eines einfachen Carriertransports (Valinomycin, Nonactin, u.a.).
C = Carrier, M^+ = Ion, CM und MC = Carrier-Ion-Komplex,
k_x = Geschwindigkeitskonstante der Reaktion x.
Die Komplexbildung bzw. die Dissoziation findet an der Grenzfläche wässrige Lösung - Membran statt. (aus (37))

konnte gezeigt werden, daß solche Porenbildner auch in biologischen Membranen funktionieren (61,62). Während bei biologischen Kanalbildnern die Struktur der Proteine und der Kanalöffnungsmechanismus vollständig unbekannt sind, ist die Struktur des Gramicidins und sein Porenbildungsmechanismus bekannt (41). Auch beim Alamethicin und seinen Analoga sind die Struktur und Vorstellungen über den Porenbildungsmechanismus veröffentlicht (52).

Nach dem derzeitigen Stand des Wissens können für die elektrische Erregbarkeit von biologischen Membranen nur spannungsabhängige Kanäle die Grundlage darstellen. Die elektrischen Erscheinungen an Zellmembranen werden erklärt als das Ergebnis des Zusammenwirkens verschiedener Populationen spannungsabhängiger Kanäle. Voltage-Clamp-Versuche (1) und Rauschmessungen (64,65) bilden die Basis für Theorien über diese Strukturen. Da in biologischen Membranen kanalbildende Proteine zunächst nicht direkt zugänglich waren, gewannen die Versuche mit spannungsabhängigen Porenbildnern in planaren Bilayern eine besondere Bedeutung. Von den vorne genannten Porenbildnern zeigen Alamethicin und Monazomycin eine starke Spannungsabhängigkeit. In keinem dieser Fälle ist jedoch der Mechanismus, der die Spannungsabhängigkeit der Porenbildung bewirkt, hinreichend bekannt.

Im Anhang werden die Eigenschaften der im Rahmen dieser Arbeit besonders wichtigen Porenbildner Gramicidin und Alamethicin genauer beschrieben.

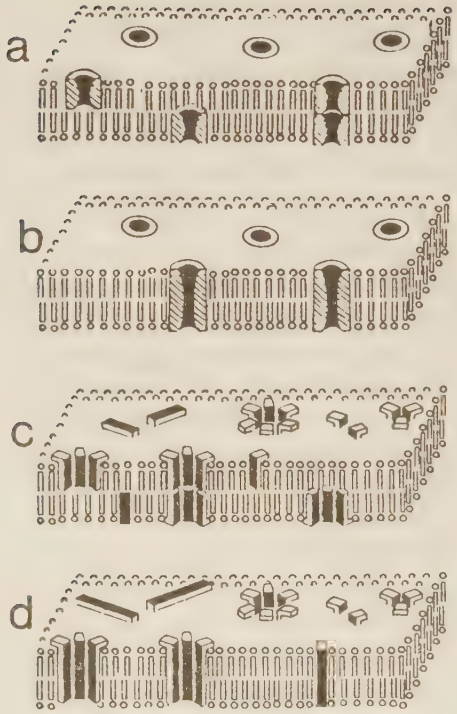


Bild 1.5

Unter a-d werden verschiedene denkbare Mechanismen der Porenbildung vorgestellt, die in Bilayern und Membranen zu ionenpermeablen Poren führen können. (aus (63))

a zeigt den Porenbildungsmechanismus von Gramicidin,
b den von chemisch dimerisiertem Gramicidin,
c den von Nystatin und Amphotericin und
d den von Alamethicin und Monazomycin.

1.4.3 Kanäle in biologischen Membranen

Zur Untersuchung von Kanälen in und aus biologischen Membranen wurden zwei Wege beschritten. Zum einen wurde eine Methode entwickelt, um einzelne Kanäle in biologischen Membranen direkt zu untersuchen, und zwar die sogenannte Patch-Clamp-Technik (66-68). Mit ihr konnten biologische Kanäle direkt untersucht werden, z.B. der durch Acetylcholin aktivierbare Kanal (ACh-akt.-Kanal), ein Na^+-Kanal in Rattenmyoballs und ein K^+-Kanal im Squid-Axon (68-74). Eine genauere Beschreibung der elektrophysiologischen Eigenschaften des ACh-akt.-Kanals ist wegen der Wichtigkeit dieses Proteins für die vorliegende Arbeit im Anhang zu finden. Durch biochemische Messungen wurde ein AChbindendes Protein charakterisiert, der Acetylcholinrezeptor (AChR). Es liegen viele biochemische Daten (75,76) sowie Messungen an proteinbeladenen Vesikeln (77) vor. Die Identität des AChR mit dem ACh-akt.-Kanal konnte bisher nicht eindeutig nachgewiesen werden.

Zum anderen wurden neue Methoden entwickelt, um Kanalbildner aus biologischen Membranen in planare Bilayer einzubauen. Hier sind zu erwähnen: die Fusion von proteinbeladenen Vesikeln mit planaren Bilayern aus Phosphatidylserin und Phosphatidylethanolamin in Anwesenheit von Ca^{++} und einem osmotischen Gradienten (34), und die Rekonstitution von Proteinen in planare Bilayer aus Lipid-Protein-Monoschichten, die sich über Vesikelsuspensionen ausgebildet hatten (78). Mit diesen Methoden konnten einige kanalbildende Proteine charakterisiert werden.

1.5 Problemstellung

Biologische Membranen sind hochkomplizierte Gebilde mit integrierten Transportsystemen. Zur Klärung ihrer Funktionsmechanismen sind noch viele Fragen zu beantworten. Als zur Untersuchung eines großen Teils dieser Probleme

geeignete Modellsysteme haben sich planare Bilayer erwiesen. Ionentransportsysteme lassen sich nach gelungenem Einbau in planare Bilayer mit hoher Genauigkeit untersuchen. Der Schwerpunkt liegt hierbei auf direkten Messungen des Stromes durch die dotierte Membran unter Variation von Temperatur, des zu untersuchenden Proteins, der Lipidumgebung usw. Es war bisher kaum möglich, elektrische Messungen an planaren Bilayern im Bereich der Phasenumwandlungstemperatur durchzuführen, da sich die planaren Bilayer im Bereich der Phasenumwandlung und darunter nicht stabilisieren ließen. Die bisher entwickelten Rekonstitutionsmethodiken zeigten zudem Probleme der Denaturierung beim Einbau empfindlicher biologischer Proteine auf.

Für diese Arbeit stand nun eine Reihe von Lipiden zur Verfügung, deren jeweilige Phasenumwandlungstemperatur im physiologisch interessierenden Temperaturbereich lag. Hieraus ergab sich für die vorliegende Arbeit die folgende Fragestellung: Es war zu untersuchen, inwieweit sich aus den neuen Lipiden stabile planare Bilayer im kristallinen Zustand bilden lassen. Die Ergebnisse von Krasne et al. (22) waren zu überprüfen und zu vervollständigen, d.h. im Bereich der Phasenumwandlungstemperatur und darunter sollten die bekannten Transportsysteme eines Carriers (Valinomycin) und der Porenbildner (Gramicidin, Alamethicin) untersucht werden, um aus den Ergebnissen Aussagen über die Transportsysteme selbst und im wesentlichen über die Struktur der Lipidmembran in diesem Bereich zu erhalten.

Da bekannt war, daß Vesikel aus reinem Lipid im Bereich der Phasenumwandlungstemperatur und darunter spontan fusionieren, während dies oberhalb T_c nicht der Fall ist (32,33), sollte in dieser Arbeit eine Fusionsmethode entwickelt werden, um biologische Kanalbildner in kristalline planare Bilayer einzubauen. Diese Methode sollte

durch die Untersuchung eines bekannten Proteins verifiziert werden, und zwar durch die Untersuchung des Acetylcholinrezeptors. Anschließend sollte eine weitere Präparation untersucht werden. Es handelte sich um Cilienmembranfragmente von Paramecien (Pantoffeltierchen), die einen Ca^{++}-spezifischen Kanal enthalten. Eine kurze Zusammenfassung der hierzu vorliegenden elektrophysiologischen und biochemischen Daten (79-84) ist im Anhang beigefügt.

2. Materialien und Methoden

2.1 Synthetische Lipide

Für die vorliegende Arbeit standen erstmals zwei synthetische gemischtkettige, gesättigte Lipide zur Verfügung *. Es handelte sich um Phosphatidylcholine, die mit einer Reinheit > 99% auch in den Positionen der Kohlenwasserstoffketten vorlagen. Diese Lipide wurden von H. Eibl nach dem in (85) beschriebenen Verfahren synthetisiert. Die verwendeten Lipide sind mit ihren Molmassen, den Phasenumwandlungstemperaturen (gemessen mit einem DSC 2 von Perkin-Elmer) und den im Text für sie verwendeten Abkürzungen in Tabelle 2.1 aufgeführt. Außerdem wurden Messungen mit 1,2-Dipalmitoylphosphatidylcholin durchgeführt. Dies Lipid wurde von der Fluka AG bezogen mit einer angegebenen Reinheit > 99%, es wurde aber zur Verbesserung der Reinheit noch dreimal aus Hexan/Ethanol (9/1 - V/V) umkristallisiert. Es ist in Tabelle 2.1 mit aufgeführt.

In Bild 2.1 sind die Strukturformeln der verwendeten Lipide dargestellt. Bild 2.2 zeigt als Beispiel die DSC-Aufheizkurve von 1,3-SMPC, Haupt- und Vorumwandlungsendotherme sind gut zu erkennen. Mit den genannten Lipiden wurden Monoschichtmessungen durchgeführt. Dies diente einmal der Kontrolle der Reinheit der Lipide, da die Schärfe des Knicks in der Druck-Flächenkurve beim Phasenumwandlungspunkt umso ausgeprägter ist, je reiner das Lipid dargestellt wurde. Zum anderen wurde nachgewiesen, daß im Druck-Flächendiagramm unterhalb T_c ein

---

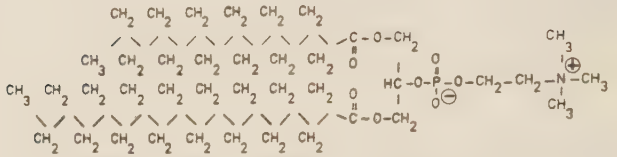
* Herrn Dr. H. Eibl vom Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie in Göttingen und seinen Mitarbeitern sei an dieser Stelle ausdrücklich gedankt. Ohne die von ihm zur Verfügung gestellten Lipide wäre die vorliegende Arbeit nicht möglich gewesen.

	Lipid	Abkürzung	Mol-masse	Hauptumwand-lungstemperatur	Vorumwandlungs-temperatur
Aufheizkurve	1-Steoroyl-3-myri-stoyl-glycerin-2-phosphorylcholin	1,3-SMPC	734 (g/mol)	31°C	2o°C
Abkühlkurve				29°C	
Aufheizkurve	1-Hexadecyl-2-te-tradecyl-rac-glyce-rin-3-phosphoryl-cholin	1,2-HTPC	678 (g/mol)	32°C	nicht beob-achtet
Abkühlkurve				28°C	
Aufheizkurve	1-Palmitoyl-2-Pal-mitoyl-sn-glycerin--3-phosphorylcholin	L-1,2-DPPC	734 (g/mol)	42°C	35°C
Abkühlkurve				4o°C	

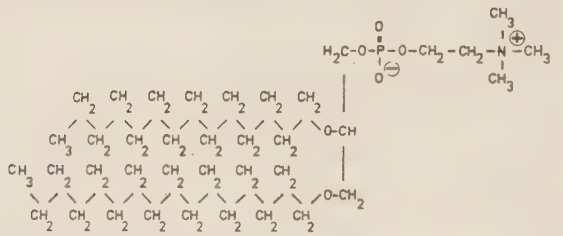
Tabelle 2.1

Daten der in der Arbeit verwendeten Lipide. Die Phasenumwandlungstemperaturen von 1,3-SMPC und 1,2-HTPC wurden von H. Eibl und J. Stümpel gemessen. Die Daten für 1,2-DPPC stammen aus (86).

1-STEAROYL-3-MYRISTOYL-GLYCERO-2-PHOSPHOCHOLIN
(1,3-SMPC)



1-HEXADECYL-2-TETRADECYL-GLYCERO-3-PHOSPHOCHOLIN
(1,2-HTPC)



1-PALMITOYL-2-PALMITOYL-GLYCERO-3-PHOSPHOCHOLIN
(1,2-DPPC)

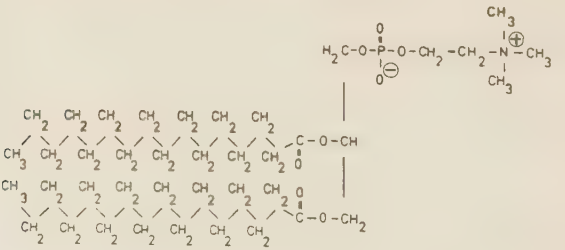


Bild 2.1

Strukturformeln der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Lipide.

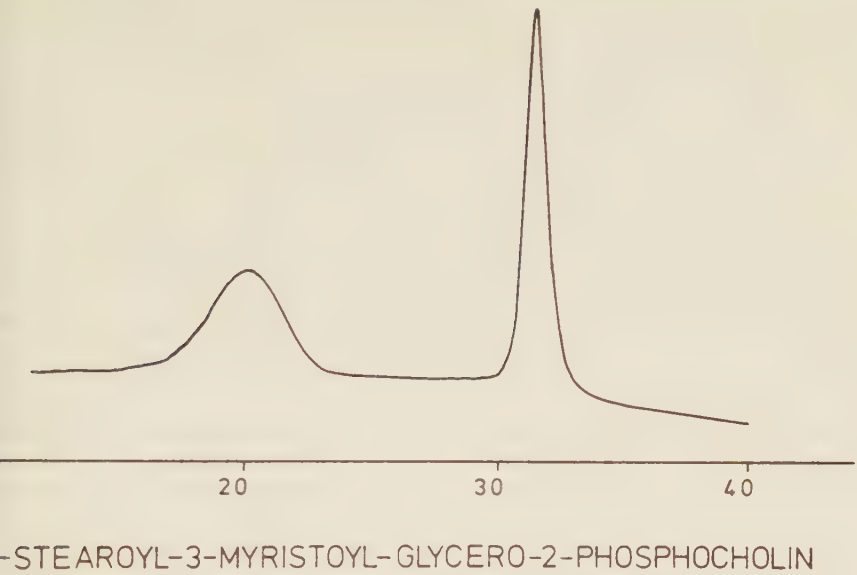


Bild 2.2

DSC-Kurve des 1,3-SMPC als des für diese Arbeit wichtigsten Lipids. Es handelt sich um eine Aufheizkurve. Die Hauptumwandlung liegt bei 31°C, die Vorumwandlung bei 2o°C. Die Kurve wurde von Herrn J. Stümpel, MPI für biophysikalische Chemie, Göttingen, aufgenommen (Perkin-Elmer DSC 2) und zur Verfügung gestellt.

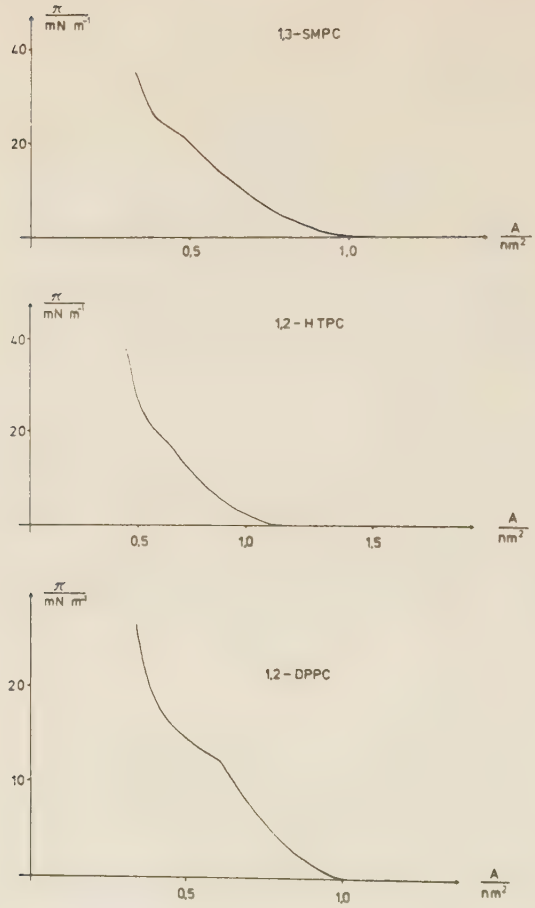


Bild 2.3

Druck-Flächendiagramme der drei verwendeten Lipide. Die Diagramme wurden auf einer Wilhelmy-Filmwaage (87) aufgenommen. Für 1,3-SMPC und 1,2-HTPC wurden die Messungen bei 2o°C durchgeführt und für 1,2-DPPC bei 29°C.

A = Fläche pro Molekül, Subphase = H_2O (bidest).

Übergang aus der flüssigen in die feste Monolayerphase erfolgt. Bei 1,3-SMPC und 1,2-HTPC bildeten sich noch bei $\pi \approx 40$ mN m^{-1} stabile Monoschichten aus (Bild 2.3). Die Messungen wurden mit einer von Fromherz entwickelten Filmwaage (87) durchgeführt, die den Druck nach der Methode von Wilhelmy (88) mißt.

Für die Versuche mit planaren Bilayern wurden die Lipide in Hexan/Ethanol (2o/1 - V/V oder 1o/1 - V/V) gelöst. Da die verwendeten Lipide keine oxidierbaren Doppelbindungen enthalten, konnten die Lösungen mehrere Tage verwendet werden.

2.2 Antibiotika

Valinomycin wurde von Calbiochem bezogen. Alamethicin $R_F 30$ Fraktion (Al-3o), wurde von Microbial Products Development and Production Laboratory, Porton, Salisbury, bezogen. Eine Probe Alamethicin $R_F 50$ Fraktion (Al-5o), wurde freundlicherweise von Prof. Dr. G. Jung, Tübingen, zur Verfügung gestellt. Durch Gegenstromverteilung gereinigtes Gramicidin A wurde freundlicherweise von Dr. E. Gross, N.I.H. Bethesda, zur Verfügung gestellt.

Von den Antibiotika wurden Stammlösungen mit $1o^{-3}$ g ml^{-1} in Ethanol angesetzt und im Kühlschrank aufbewahrt. Die Stammlösungen wurden bei Bedarf mit Aqua bidest. weiter verdünnt.

2.3 Chemikalien

Von H.T. Baker Chemicals B.V., Deventer, Holland, wurden bezogen: Hexan, Chloroform, Ethanol und Methanol (Reinheit > 99%); KCl (Qualitätsstufe Baker grade). Von der Fluka AG, Buchs KG, Schweiz, wurden bezogen: Decan, Hexadecan, Methanol (Reinheit > 99%); Cholesterin (Qualität purissimum). Von Sigma Chemical Company, München, wurde bezogen: Hepes, Trizma-Base (Qualität Reagent Grade). Von E. Merck, Darmstadt, wurden bezogen: NaCl, $CaCl_2$, $MgCl_2$ und alle übrigen in den aufgeführten Messungen verwendeten Salze (Qualität p.a.). Eine Probe QX-222 wurde von Dr. E. Neher vom MPI für biophysikalische Chemie, Göttingen, zur Verfügung gestellt. Acetylcholin, Carbachol und Hexamethonium wurden von Prof. Dr. A. Maelicke vom MPI für Ernährungsphysiologie, Dortmund, zur Verfügung gestellt. Suberyldicholin und α -Bungarotoxin sind eine freundliche Gabe von Dr. B. Sakmann vom MPI für biophysikalische Chemie Göttingen.

2.4 Biologische Präparationen

Die in dieser Arbeit beschriebene Methode des Einbaus hydrophober biologischer Membranproteine in planare Bilayer durch Fusion von Vesikeln mit planaren Bilayern im Bereich und unterhalb der Temperatur der Lipidphasenumwandlung wurde unter Verwendung verschiedener Präparationen getestet. In der Reihenfolge der Darstellung in Kapitel 3.2 sind dies:

ia. Membranfragmentvesikel von Torpedo marmorata mit einem hohen Anteil an Acetylcholinrezeptor-Protein (AChR). Es wurden Präparationen von G. Fels (MPI für Ernährungsphysiologie, Dortmund) und F.J. Barrantes (MPI für biophysikalische Chemie, Göttingen) verwendet* (89,90). Die Präparationen wurden aus den elektrischen Organen von frisch getöteten Fischen hergestellt. Sie zeigten in der SDS Gel-Elektrophorese eine Untereinheitenaufteilung entsprechend $\alpha_2\ \beta\ \gamma\ \delta$ mit den Molmassen α: 39.000 g mol^{-1}, β: 50.000 g mol^{-1}, γ: 60.000 g mol^{-1} und δ: 65.000 g mol^{-1}. Zusätzlich traten zwei Komponenten mit den Molmassen 43.000 g mol^{-1} und 90.000 g mol^{-1} auf. Die Rezeptorkonzentration lag bei 2 bis 4,5 µ mol α-Toxin-Bindungsstellen pro g Protein pro 100 ml Pufferlösung.

ib. Membranfragmentvesikel, die alkalisch (pH 11, 1h) behandelt wurden, wurden von F.J. Barrantes und A. Maelicke (MPI für Ernährungsphysiologie, Dortmund) zur Verfügung gestellt (91). Die alkalische Behandlung führt zur Abtrennung der 43.000er-Komponente. Diese periphere Einheit wird daher nicht in die Untereinheitenstruktur des AChR einbezogen.

In beiden Fällen (ia,ib) wurden Versuche nur in den ersten zwei Tagen nach der Herstellung der Vesikelpräparationen durchgeführt. Die Vesikel wurden vor den Versuchen 3o min in 1M Saccharose, 1M KCl (oder 1M NaCl), 4 mM Tris-Hepes, pH=7,4 vorinkubiert und so gegenüber der späteren Elektrolytlösung osmotisch aufgeladen. Anschließend wurden sie auf Eis aufbewahrt.

ic. Zur vollständigen Aufreinigung des Rezeptorproteins wurden elektrische Organe von Torpedo marmorata homogenisiert, und zwar in 16o mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM $MgCl_2$, 1o mM $CaCl_2$, pH=7,4. Die obigen Na/K und Ca/Mg Verhältnisse wurden während des gesamten Aufreinigungsverfahrens beibehalten (92). Das Rezeptorprotein wurde durch Detergenz (Triton X-1oo) aus den Membranfragmenten gelöst. Anschließend wurde die Lösung auf eine Sepharose-Säule gegeben, die kovalent gebundenes α-Cobratoxin enthielt. Durch die spezifische Bindungsfähigkeit zum α-Toxin diente dies als Affinitätssäule für den AChR, d.h. alle Proteine mit Ausnahme des AChR wurden durch eine Pufferlösung herausgewaschen. Der AChR wurde dann mit einer Lösung, die o,1 M Hexamethonium und o,o5% Tween 8o enthielt, eluiert. Dann wurde der AChR in eine Hydroxylapatit-Säule überführt. Durch die Anlagerung des AChR an Grenzflächen-fixiertes Ca^{++} konnte überschüssiges Detergenz mit einer Lösung (2o mM Tris-HCl, pH=7,o) herausgewaschen werden. Der Austausch des an den AChR angelagerten Detergenz gegen 1,3-SMPC wurde mit derselben Pufferlösung, die jetzt mit 1,3-SMPC gesättigt war, durchgeführt. Dieser Vorgang wurde entweder durch UV-Absorption oder über eine Radioaktivitätsmessung kontrolliert. Nachdem die Detergenzkonzentration unter die Nachweisgrenze gesunken war, wurde

der von Lipid umgebene AChR mit einer Lösung, die o,2 M Na,K-Phosphat-Puffer enthielt, von der Hydroxylapatit-Säule entfernt. Im Eluat lag der AChR direkt in der Form von Protein-Lipid-Vesikeln vor. Die Konzentration an AChR betrug 8-1o µmol α -Toxin-Bindungsstellen pro g Protein pro 1oo ml Pufferlösung (92,93). Die Präparation wurde zur osmotischen Aufladung wie oben beschrieben behandelt und konnte ca. eine Woche verwendet werden. Diese Vesikelpräparationen stellte mir A. Maelicke* (MPI Dortmund) zur Verfügung.

id. Fragmentvesikel aus Cilienmembranen von Paramecium tetraurelia, Wildtyp und Mutante, wurden von J.E. Schultz* (Universität Tübingen) hergestellt. Dazu wurden von Paramecium tetraurelia der Wildtyp 51 s und die PawnA-Mutante d4-94 in 2o l Bioreaktoren, wie in der Literatur beschrieben (94), axenisch gezüchtet. Die frisch geernteten Paramecien wurden durch Calciumschock deciliiert (95,96). Die Cilien wurden durch Differentialzentrifugation gereinigt und auf Reinheit überprüft (97). Die Herstellung der Fragmentvesikel aus den Cilienmembranen erfolgte über Dekompression gegen den Außendruck mit einer French Press Anlage bei 4°C in 1o mM MOPS-Puffer, pH=7,2. Anschließend wurden die Membranvesikel durch Zentrifugation aufkonzentriert, Säulen-chromatographisch gereinigt und in Proben a 25 µg Protein pro 1oo µl Pufferlösung sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Zur Benutzung wurde jede Probe nur einmal aufgetaut und an demselben Tag verwendet. Die Vesikel wurden in 2oo mM Saccharose, 1o mM MOPS-Puffer, pH=7,2 equilibriert.

---

*Den Herren Dr. G. Fels, Dr. F.J. Barrantes, Prof. Dr. A. Maelicke und Prof. Dr. J.E. Schultz sei ausdrücklich dafür gedankt, daß sie die genannten Vesikelpräparationen zur Verfügung stellten.

2.5 Methoden der Herstellung planarer Bilayer

Seitdem es Mueller und Rudin 1962 (8) erstmals gelang, planare Bilayer herzustellen, wurden die Methoden zur Herstellung künstlicher Membranen wesentlich erweitert und verbessert. So gelang es Montal und Mueller 1972 (98), durch Verwendung leicht flüchtiger Lösungsmittel nahezu lösungsmittelfreie Membranen herzustellen. Das gelöste Lipid wurde auf einer Wasser-Luft-Grenzfläche gespreitet. Nach Abdampfen des Lösungsmittels ließ sich dann aus den beiden Monolayern in den jeweiligen Kammern ein Bilayer bilden. Einen weiteren Fortschritt hin zu wirklich lösungsmittelfreien Bilayern brachte die Methode, die sich auf einer Vesikelsuspension ausbildende Monoschicht zur Herstellung von planaren Membranen heranzuziehen (78).

Die experimentelle Meßkammer besteht in allen Fällen aus einer zweiteiligen Teflonküvette mit einer Trennwand aus Teflon, in der sich eine Bohrung befindet. In die beiden Küvettenkammern werden Elektrolytlösungen gefüllt und über die Bohrung wird der planare Bilayer gezogen. In die wässrigen Lösungen tauchen Elektroden, die zur Messung des Stromes durch den planaren Bilayer dienen.

Bei der Mueller-Rudin-Methode wird um die Bohrung Lipidlösung aufgetrocknet, da sonst die Membranen instabil sind. Anschließend füllt man die Küvette bis über die Bohrung mit Salzlösung. Danach wird auf die Bohrung ein Tropfen Lipid/Decan-Lösung gebracht und dieser mit einem Spatel breitgezogen. Man wartet, bis die Membran im reflektierten Licht schwarz erscheint. Diese Membranen enthalten noch einen hohen Anteil an Lösungsmittel.

Bei der Montal-Mueller-Technik wird die Bohrung, ebenfalls aus Stabilitätsgründen, mit Hexadecan oder Squalen

vorbehandelt. Dann füllt man die Küvette bis knapp unterhalb der Bohrung mit Salzlösung. Auf deren Oberfläche wird auf jeder Seite der Trennwand eine definierte Menge Lipid aus einem leichtflüchtigen Lösungsmittel, z.B. Hexan, gespreitet. In der Regel ist die Menge an Lipid größer als die zur Ausbildung einer Monoschicht erforderliche Menge. Nach einigen Minuten, in denen der größte Teil des Lösungsmittels verdunstet, wird auf beiden Seiten der Trennwand der Salzlösungsspiegel soweit erhöht, daß er über der Bohrung steht. Dabei bildet sich über der Bohrung ein Bilayer. Das Verfahren der Monoschichtbildung aus Vesikelsuspensionen ähnelt der Montal-Mueller-Technik, wobei hier von den in den Elektrolyten befindlichen Vesikeln die Monoschichten gebildet werden. Sie führen dann ebenso zur Bildung von Bilayern wenn der Spiegel der Salzlösungen über die Bohrung geführt wird.

Mueller-Rudin Bilayer lassen sich bisher auf Bohrungen von o,5 mm Ø bis ca. 5 mm Ø bilden, Montal-Mueller und Schindler - Membranen auf Bohrungen von o,1 mm Ø bis ca. o,5 mm Ø. Bild 2.4 zeigt alle drei Verfahren in ihrer prinzipiellen Handhabung.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Montal-Mueller-Technik dahingehend verbessert, daß eine Methode zur Herstellung von Teflonsepten mit sehr kleiner membrantragender Bohrung entwickelt wurde. Diese Methode basiert auf einem Verfahren von Schindler (99) und wird im nächsten Kapitel ausführlich behandelt.

Die sich hierdurch ergebende Möglichkeit, planare Bilayer sehr kleiner Fläche herzustellen, führte zu einer Reihe wichtiger experimenteller Verbesserungen. Die Strom- und Zeitauflösung wird u.a. begrenzt durch das Membranrauschen, das proportional der Wurzel aus der Membranfläche ist. Durch Verkleinerung der Fläche kann

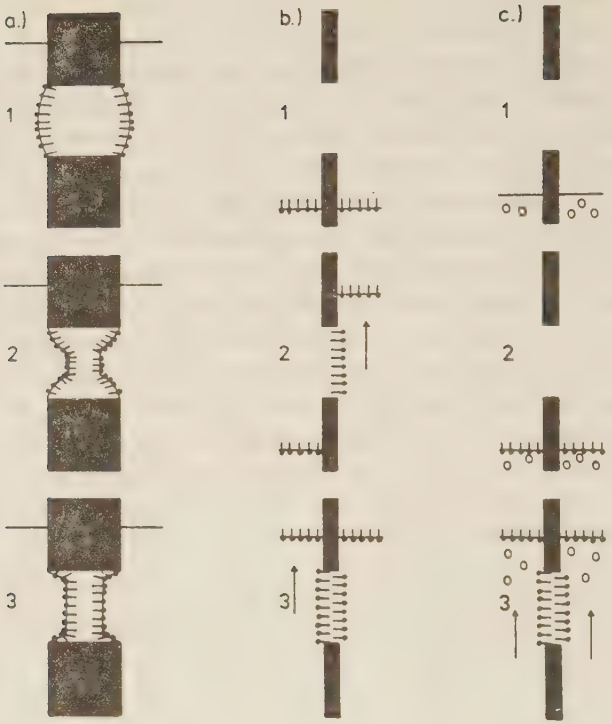


Bild 2.4

Methoden der Bilayerherstellung

a) Mueller-Rudin-Technik, ausgehend von einem aufgetragenen Tropfen einer Lipid/Kohlenwasserstoff-Lösung auf einer Bohrung (8)

b) Montal-Mueller-Technik, ausgehend von aus leichtflüchtigem Lösungsmittel gespreitetem Lipid und Bilden einer Lipidmonoschicht auf der Oberfläche der Badlösung (98)

c) Schindler-Technik, ausgehend von Monoschichten, die sich auf der Oberfläche einer Lipidvesikel enthaltenden Badlösung bilden. Die Monoschichten befinden sich dabei (nach Schindler) im Gleichgewicht mit der Vesikellösung. (78)

somit das Signal-Rausch-Verhältnis verbessert und die Auflösung der Messungen gesteigert werden. Membranen sehr kleiner Fläche sind stabiler bei hohen Membranspannungen als solche großer Fläche, so daß bei höheren Spannungen gemessen werden kann. Dies liefert höhere Stromsignale. Die Stabilität von planaren Membranen im kristallinen Zustand nimmt mit der Verkleinerung der Fläche stark zu. So kann auf eine Vorbehandlung der Teflontrennwand verzichtet werden, wenn der Membrandurchmesser kleiner als ca. 5o µm ist; dies eröffnet die Möglichkeit, wirklich lösungsmittelfreie Membranen herzustellen. Das unten beschriebene Verfahren erlaubt es, Bilayer bis zu einem Durchmesser von ca. 2o µm herzustellen. Dies entspricht einer Membranfläche von ca. 3oo μm^2.

2.6 Aufbau der Meßapparatur

2.6.1 Gesamtübersicht

Bild 2.5 zeigt ein Blockschema des gesamten experimentellen Aufbaus. Die Membranen werden nach den oben beschriebenen Methoden auf die Bohrung in der Teflontrennwand aufgezogen. In die beiden Kammern ist jeweils eine Elektrode eingetaucht. Sie dienen zum Anlegen der Membranspannung, sowie zum Ableiten des Membranstromes (Ag-AgCl Elektroden oder platinierte Platinelektroden). In die wässrige Lösung wird ein Temperaturfühler zur Messung der Arbeitstemperatur getaucht (PT 1oo). Die Küvette ist von einem hohlen Metallblock umgeben, der von einem Thermostaten mit temperierter Flüssigkeit durchströmt wird.

Die Membranspannung wird durch einen einfachen Spannungsgeber oder durch einen Funktionsgenerator erzeugt. Der

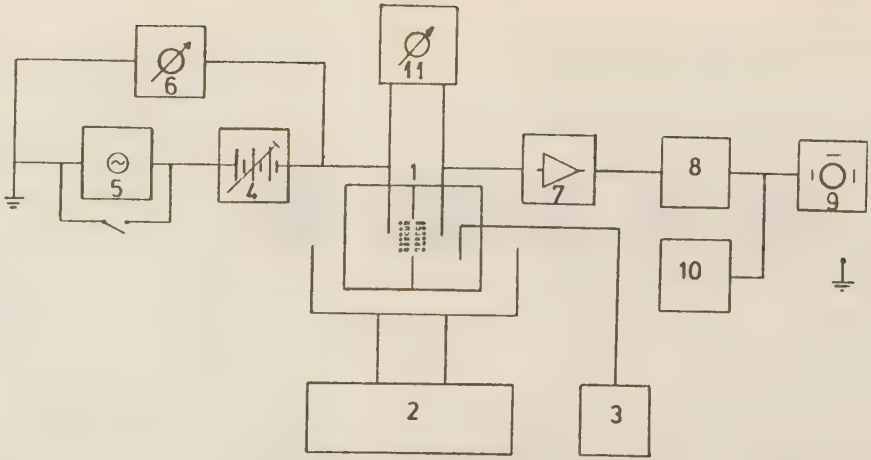


Bild 2.5

Blockschaltbild des gesamten Meßaufbaus

1 Kabinett mit Teflonküvetten, Elektroden, Membran
2 Thermostatierung (Lauda K4R oder Haake K11)
3 Temperaturmessung (PT 100 mit LM-PT 100-3L von PME)
4 Spannungsquelle, variabel, erdfrei (Eigenbau)
5 Funktionsgenerator (HP 3300 A)
6 Spannungsmessung (Eigenbau)
7 Verstärkereinheit (Eigenbau)
8 Universalfilter (Kemo VBF 8)
9 Oszillograph (Tektronix 7623 A)
1o Registrierung/ FM-Bandgerät (Racal Store 4D) / x-y-t-Schreiber (Philips 8141 + 9885)
11 hochohmiges mV-Meter zur Messung der Potentialdifferenz über der Membran (Keithley 6o2 solid state Elektrometer)

Bild 2.6

Foto der Meßapparatur mit fertig eingebauter Kassette und Elektroden

Strom wird mittels eines hochohmigen Strom-Spannungswandlers gemessen und das resultierende Spannungssignal über einen Filter an den Oszillographen gegeben. Parallel werden dieses Signal und auch weitere Meßsignale auf einem FM-Magnetbandgerät aufgenommen (Racal Store 4D). Zusätzlich ist ein Schreiber angeschlossen. Bild 2.6 zeigt die Meßapparatur in einer photographischen Aufnahme.

2.6.2 Mechanischer Aufbau

Zur Herstellung von Membranen nach der Montal-Mueller-Technik wurde eine zweiteilige Küvette verwendet. Jedes Teil (Kammer) ist an einer Seite mit einer Bohrung von o,5 cm Durchmesser versehen. Diese vergrößert sich konisch zum Kammerinneren. Die beiden Kammern werden Bohrung an Bohrung in einem Spannrahmen zusammengefügt. Zwischen beide Bohrungen wird eine dreischichtige Teflonscheibe mit einer kleinen Bohrung gelegt, die die Membran trägt; diese wird in der Regel mit Hexan/Hexadecan (2/1-V/V) vorbehandelt. Die genannten Teile sind in Bild 2.7 abgebildet.

An die Bohrung in der Teflonscheibe (Septum) müssen sehr hohe Anforderungen bezüglich der Randschärfe gestellt werden, ohne daß dort thermische Zersetzungsprodukte des Teflon entstehen. Zunächst wurden unter diesen Voraussetzungen hergestellte Septen, die von H. Schindler* zur Verfügung gestellt wurden, verwendet. Eine von ihm entwickelte Technik (99) erlaubt es, Bohrungen bis herunter zu einem Durchmesser von 15o µm mit Randunschärfen kleiner 1 µm herzustellen.

---

* Herrn Dr. H. Schindler, Biozentrum Basel, danke ich für die zur Verfügung gestellten Septen und insbesondere für die Möglichkeit, seine Methode der Septenherstellung in Basel zu lernen.

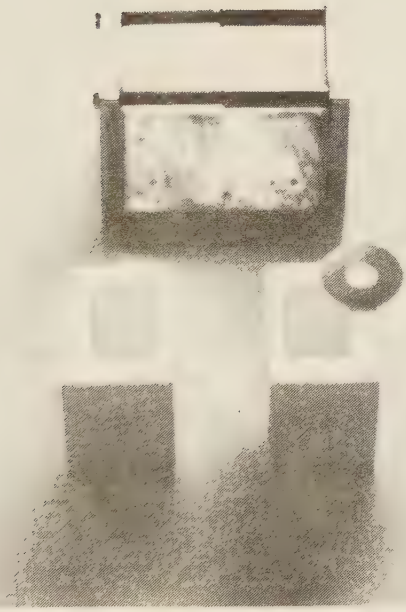


Bild 2.7

Einzelteile des Küvettenaufbaus:
2 Teflonkammern, dreischichtige Teflonscheibe, Spannrahmen.

Da die damit gegebenen Membranflächen jedoch für einige Anwendungen noch zu groß waren (Stromauflösung, Stabilität von Membranen im kristallinen Zustand), wurde das Schindlersche Verfahren weiterentwickelt, so daß nun Löcher bis zu ca. 2o µm Durchmesser mit Randunschärfen kleiner 1 µm möglich sind. Das Verfahren wird im folgenden beschrieben: Zunächst werden aus glasfaserverstärkter Teflonfolie von 8o µm Dicke Ringe mit einem Innendurchmesser von 2 mm oder 5 mm und einem Außendurchmesser von 12 mm ausgestochen. Die Folie wurde von der Firma Breitenbach, Wuppertal, bezogen. Dann werden aus 5 µm oder 12 µm dicker Teflon--FEP-Folie der Firma M. Huth Industrietechnik GmbH, Starnberg, Scheiben von 12 mm Ø ausgestochen. Zwischen zwei Teflonringe (8o µm) wird eine Teflonscheibe (5 µm, 12 µm) gelegt und diese werden zusammen in einen gehärteten Stahlblock gespannt. Der Stahlblock wird in einem 9oo°C heißen Keramikofen 9o s dynamisch erhitzt. Dies führt dazu, daß sich der Stahlblock mit den Teflonscheiben auf ca. 4oo °C, also knapp über die Erweichungstemperatur des Teflons, erwärmt, bevor er aus dem Ofen genommen wird. Dabei schmelzen die Teflonfolien an und gehen eine elektrisch isolierende Verbindung ein. Der Stahlblock mit dem Teflonseptum wird in einem Wasserbad abgeschreckt und das Septum entnommen. Eine Reinigung in Chloroform-Methanol schließt sich an. Dann werden Glasmikroelektroden gezogen und die Spitzen auf den erforderlichen Durchmesser abgebrochen und angeschliffen. Das Septum wird auf ein Gegenlager mit einer kleinen Bohrung gelegt und anschließend die dünne innere Teflonfolie mit einer der Glaselektroden im Bereich der Gegenlagerbohrung durchstochen. Es folgen eine weitere Reinigung in Chloroform-Methanol und eine Kontrolle unter dem Mikroskop. Anschließend werden die Septen zur Verminderung der Randunschärfen und zur Straffung der inneren Folie noch einmal in den Stahlblock gespannt und 15 s in dem Keramikofen erhitzt. Im Anschluß folgten ein weiterer Reinigungsgang und die Endkontrolle. Das zweite Erhitzen kann bei nicht extremen Ansprüchen

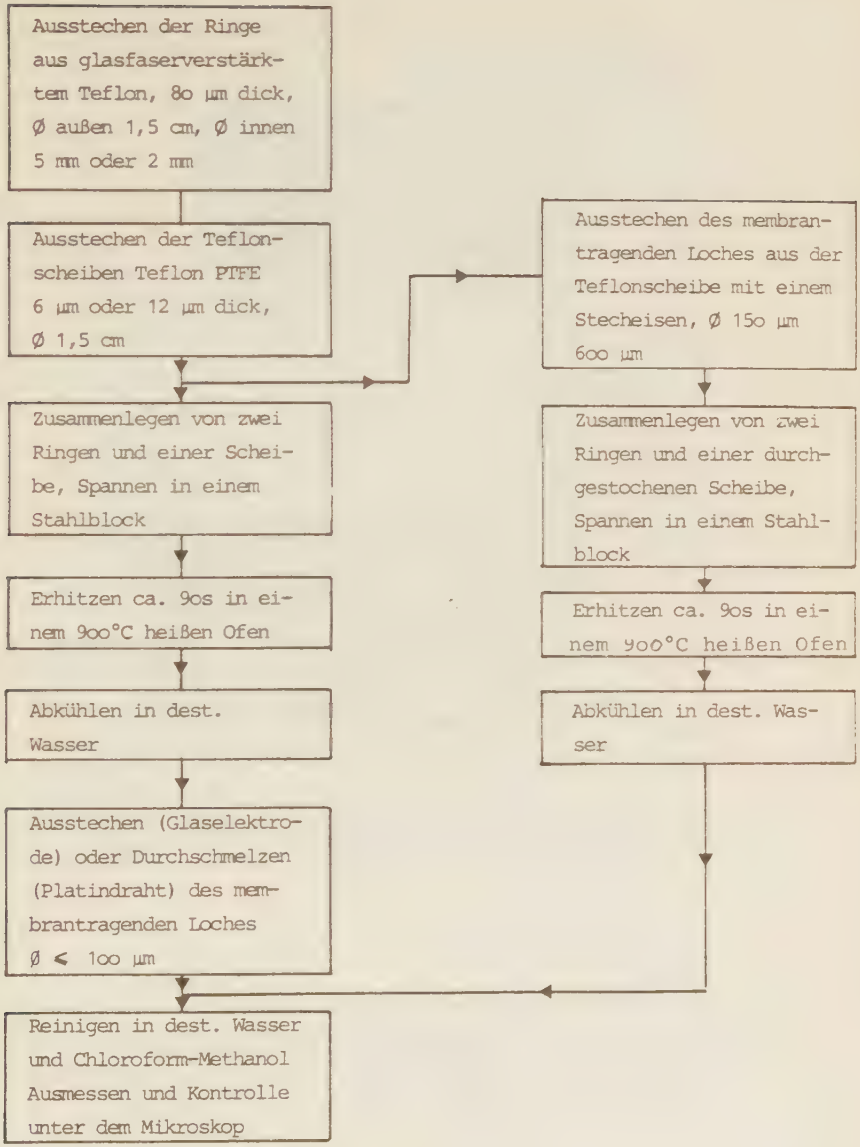


Bild 2.8 Flußdiagramm der Septenherstellung für Montal-Mueller Membranen. Es handelt sich um eine Erweiterung des Verfahrens von Schindler (99) auf Septen mit Löchern ≤ 1oo µm.

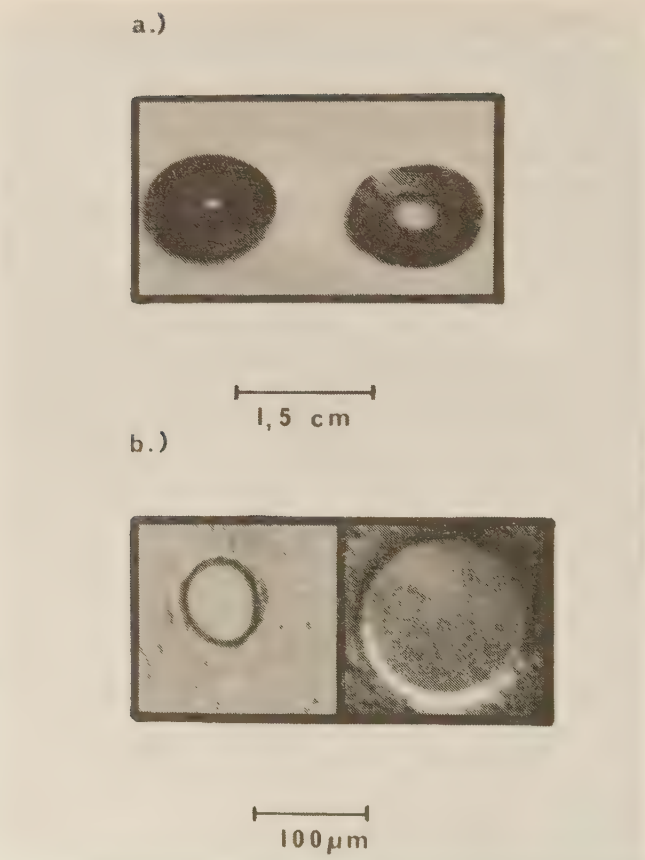


Bild 3.9

a) Die zwei verschiedenen Typen von fertigen Septen
b) Membrantragende Löcher in je einem Septum, die mit Glaselektroden ausgestochen wurden: links Ø≈5o µm, rechts Ø ≈ 15o µm

auch entfallen. Bild 2.8 zeigt ein Flußdiagramm der Septenherstellung und Bild 2.9 zwei fertige Septen. Als Variation des Verfahrens wurden unter dem Mikroskop in die Septen Löcher mittels eines kurzzeitig aufglühenden Platindrahtes geschmolzen, ohne daß das Teflon dabei berührt wurde. Die elektrische Kapazität des Teflonseptums war bei Verwendung der 5 µm dicken Teflonfolie so groß, daß in diesem Fall Ringe mit kleinem Innendurchmesser (Ø = 2 mm) verwendet werden mußten.

Zur Reinigung werden alle Teflonteile nach Benutzen mit Chromschwefelsäure 3o min bis 9o min behandelt und dann einen Tag unter fließendem Wasser aufbewahrt. Nach 25 min Kochen in Aqua dest. folgt eine 3o min lange Behandlung mit KOH. Anschließend werden die Teile wieder gewässert und gekocht. Zum Schluß werden sie mit Hexan-Ethanol ausgespült.

2.6.3 Elektronischer Aufbau

Bei Messungen mit planaren Bilayern müssen hohe Anforderungen an die verwendete Elektronik gestellt werden. Wichtigster Punkt ist die Verwendung eines hochwertigen Strom-Spannungswandlers. An ihn werden folgende Anforderungen gestellt: bei einer Membran von 15o µm Durchmesser soll eine Stromauflösung von o,5 pA und eine Zeitauflösung von 1 ms erreicht werden. In Bild 2.1o.a ist die verwendete Schaltung mit den Daten der Einzelteile aufgeführt. Entscheidend für das erreichte Ergebnis ist neben der Verwendung selektierter Bauteile die Optimierung in Bezug auf parasitäre Kapazitäten und Rauschquellen sowie auf Brummfreiheit. Die Verbindung zwischen invertierendem Eingang des Operationsverstärkers und Meßelektrode muß möglichst kurz sein,und die Stromversorgung des Verstärkers muß über Batterien erfolgen. Weitere Verbesserungen können durch Filter und mechanische Vorkehrungen erreicht werden. Die erreichte Auflösung ist in Bild 2.1o.b angegeben.

Die Ausgangsspannung des Strom-Spannungswandlers beträgt

$$U_a = I_M \cdot R = \frac{U_e}{R_M} \cdot R$$

I_M = Strom über den planaren Bilayer , U_e = Eingangsspannung
R_M = Membranwiderstand , R = Rückkopplungswiderstand

Der Frequenzgang wird begrenzt nach

$$f_3dB = \frac{1}{R \cdot C}$$

f_3dB = Frequenz, bei der die Ausgangsamplitude des Wandlers um 3 dB gegenüber dem Maximalwert abgefallen ist
C = Rückkopplungskapazität

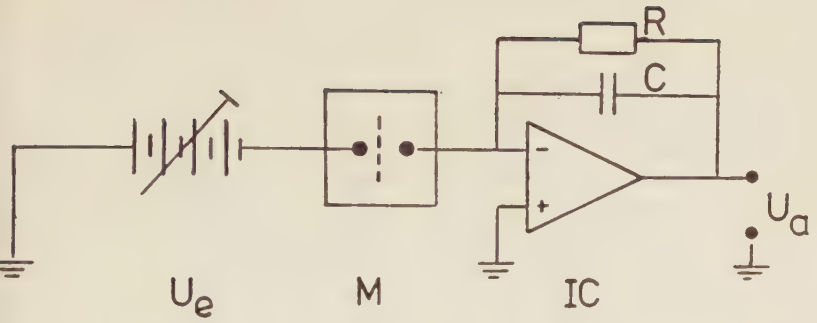


Bild 2.1o.a

Schaltung des elektronischen Meßkreises mit sehr hohem Eingangswiderstand

U_e	variable externe Spannungsquelle
M	Membransystem
R	Rückkopplungswiderstand (Metallschichtwiderstand, Pyroflex)
	R = 5o MΩ
C	Rückkopplungskondensator
	C = 1o pF
IC	Operationsverstärker BB 3523L, Eingangswiderstand gegen Erde $1o^{13}\Omega$, weitere Daten siehe (1oo).

Mit den angegebenen Werten ergibt sich eine rechnerische Bandbreite von 2 kHz. Die gemessene Bandbreite lag aufgrund von parasitären Kapazitäten etwas niedriger.

Bei einer Membranfläche von ca. $1o^{-4}$ cm^2 erhielt man eine Auflösung von $\Delta I \cdot \Delta t = o,5$ fA · s

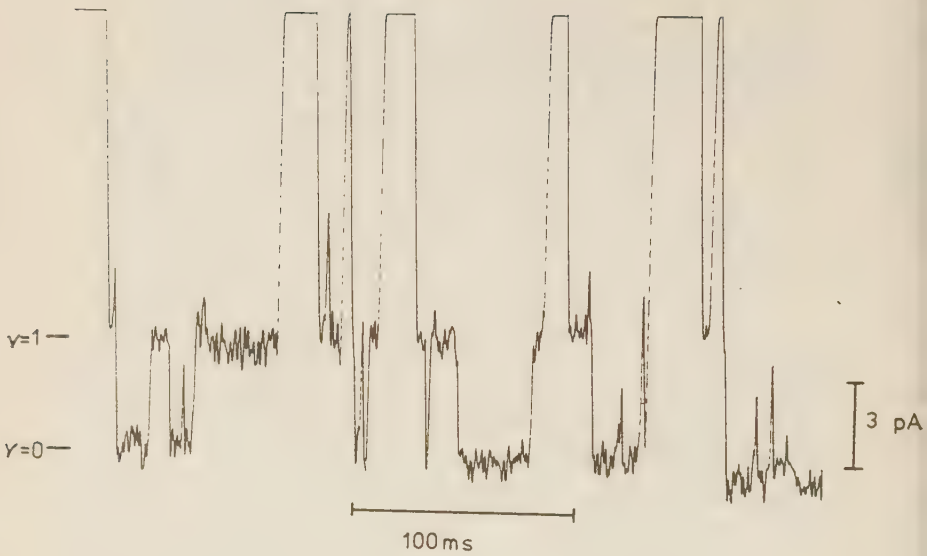


Bild 2.1o.b

Alamethicinporenfluktuation in 3 M KCl als Demonstration der erreichbaren Auflösung: $\Delta I \cdot \Delta t$ = o,5 fA·s. Die experimentellen Bedingungen sind:

Temperatur: 21°C , Membranfläche: o.7 $1o^{-4}$ cm^2
Spannung: 12o mV , Salzlösung: 3 M KCl, pH 5,9
C_{Al}: 1 µg cm^{-3} , Lipid: bact. Phosphatidylethanolamin
(siehe auch Bild 6.4).

Zur Messung der Kapazität des planaren Bilayers wurden zwei Verfahren verwendet. Sie sind in Bild 2.11 dargestellt. Methode a) erlaubt nur diskrete Kapazitätsmessungen. Dazu wird der Wert der externen Spannungsquelle, somit die Spannung über der Membran und dem Vorwiderstand R_V sprunghaft von O auf U_e geändert und der zeitliche Verlauf des resultierenden Stromes gemessen.
Der Membranstrom I(t) folgt der Gleichung:

$$I(t) = \frac{U_e}{R_M + R_V} = \frac{U_e}{R_M + R_V} \cdot \frac{R_M}{R_V} \cdot e^{-t/\tau}$$

mit

$$\tau = C_M \cdot \frac{R_V \cdot R_M}{R_V + R_M}$$

wobei R_M = Membranwiderstand
C_M = Membrankapazität
R_V = Vorwiderstand

Wählt man $R_M >> R_V$, so berechnet sich τ aus

$$\tau = C_M \cdot R_V.$$

Zur kontinuierlichen Messung der Kapazität ist die Methode b) geeignet. Es wird auf die Membran ein Wechselspannungssignal U_e gegeben. Die Amplitude wird möglichst gering, $U_{e,ss} <$ 1 mV, und die Frequenz knapp unterhalb der Eckfrequenz (3dB Punkt, Tiefpass) des Verstärkers gewählt (ω =1-2 kHz). Das resultierende Signal U_a wird über einen Bandpaß gefiltert, gleichgerichtet und als Gleichspannungswert U_{Mess} auf einem Schreiber registriert.
Es gilt:

$$\frac{U_e}{R_M} + \frac{dU_e}{dt} \cdot C_M - \frac{U_a}{R} - \frac{dU_a}{dt} \cdot C = 0$$

wobei R_M, C_M wie unter a),
R = Rückkopplungswiderstand, C = Rückkopplungskapazität

a.)

b.)

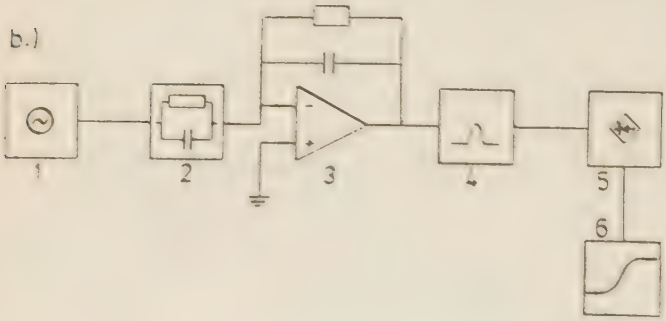


Bild 2.11

Schaltungen zur Kapazitätsmessung bei planaren Bilayern

a) diskrete Messung

1 Spannungspulsgeber
R_V Vorwiderstand
2 Ersatzschaltbild der Membran bestehend aus R_M und C_M
3 Strom-Spannungswandler
4 Registrierung $I = f(t)$

b) kontinuierliche Messung

1 Sinusgenerator
2 Ersatzschaltbild der Membran bestehend aus R_M und C_M
3 Strom-Spannungswandler mit Rückkopplungszweig bestehend aus R und C
4 Bandpaßfilter
5 Gleichrichter
6 Registrierung $U_{Mess} = \text{const.} \cdot C_M$

mit

$$U_a = A \sin \omega t + B \cos \omega t$$

als Lösungsansatz.

Durch Auflösen der Differentialgleichung und Berechnen von A und B erhält man nach Berücksichtigung der Gleichrichtung und bei Konstanthalten von ω, R, C, R_M und U_e die Beziehung (1o1).

$$U_{Mess} = \text{const.} \cdot C_M$$

Durch Eichung mit einer elektrischen R_M, C_M - Membranersatzschaltung läßt sich die Proportionalitätskonstante auch meßtechnisch bestimmen.

2.7 Vorzeichenkonvention

Die Angabe von Vorzeichen und Membranspannung bezieht sich bei den Messungen an reinen Bilayern, Carriern, Gramicidin und Alamethicin (Kap. 3.1) immer auf die vordere Küvettenhälfte (Bild 2.6), da die hintere Elektrode, die direkt auf den invertierenden Eingang des Operationsverstärkers führt, virtuell auf Erdpotential liegt. Bei den Fusionsexperimenten (Kap. 3.2) wurde die Vesikelzugabeseite (im allgemeinen die vordere Kammer) als Bezugspotential gewählt. Die Angabe von Vorzeichen und Membranspannung gelten hier für die gegenüberliegende Kammer. Die Gründe für diese Wahl werden in der Diskussion genannt.

3. Ergebnisse

3.1 Eigenschaften planarer Bilayer im Bereich der Temperatur der Lipidphasenumwandlung

3.1.1 Reine planare Bilayer

Zunächst wurde untersucht, unter welchen Bedingungen planare Bilayer, bestehend aus nur einer reinen Lipidkomponente, im Bereich der Phasenumwandlungstemperatur (T_c) sowie unterhalb T_c stabil sind, und welche Auswirkungen die Phasenumwandlung auf die elektrischen Eigenschaften planarer Bilayer hat. Als Meßparameter dienten dazu die Leitfähigkeit und die Kapazität des Bilayers. Als erstes wurden die nahezu lösungsmittelfreien Membranen, die nach der Montal-Mueller-Technik aus 1,3-SMPC gebildet worden waren, untersucht. Bild 3.1 zeigt die Abkühlkurve eines Einkomponenten-Bilayers, und zwar in gleichzeitiger Aufzeichnung a) die spezifische Leitfähigkeit bzw. den Strom pro cm^2 Membranfläche bei vorgegebener Spannung, und b) die spezifische Kapazität. Der Stromfluß über den Bilayer war im Bereich zwischen 18°C und 35°C nahezu konstant, mit Ausnahme des Bereichs um 28°C bis 29°C, in dem spontane Stromfluktuationen auftraten. Diese Stromfluktuationen waren statistischer Natur, und sie traten in gruppenförmigen Erscheinungen auf. Es konnten jedoch keine diskreten Stromniveaus aufgelöst werden. Das Temperaturintervall, in dem diese Fluktuationen auftraten, deckt sich mit dem kalorimetrisch gemessenen Phasenumwandlungsbereich für den Abkühlvorgang (Tabelle 2.1). Bei einem Aufheizvorgang traten die spontanen Stromfluktuationen innerhalb eines 2 - 3°C höheren Temperaturbereiches auf. Dies stimmt ebenfalls mit den kalorimetrischen Meßdaten überein (Tabelle 2.1). Die spezifische Kapazität des Bilayers ist oberhalb und unterhalb T_c unterschiedlich, jedoch konstant. Im Bereich von 29°C bis 27°C tritt ein kontinuierlicher Abfall

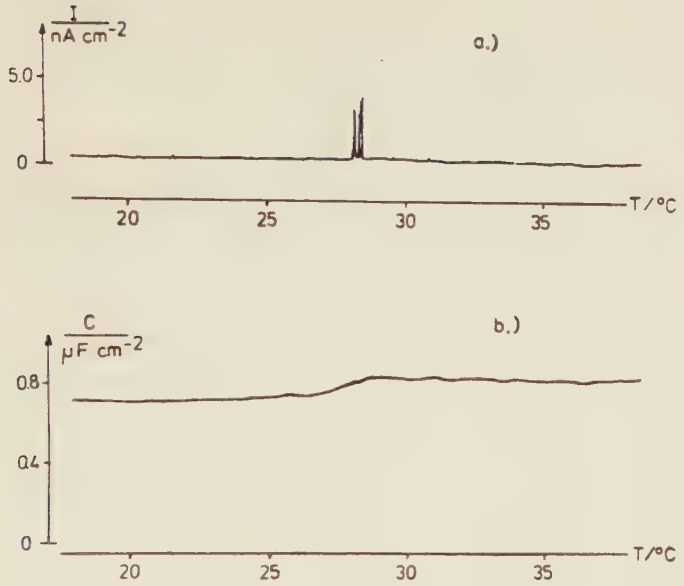


Bild 3.1

Abkühlkurve eines planaren Bilayers aus 1,3-SMPC, die Phasenübergangseffekte im Bereich der kalorimetrisch gemessenen Phasenumwandlungstemperatur des reinen Lipids zeigt.

Montal-Mueller-Technik, Membranfläche: o,o2 mm², Salzlösung: 1 M KCl, pH 5,8, Abkühlrate: 1,5°C min^{-1}

a) Strom pro cm² Membranfläche bei konstanter angelegter Spannung von 3o mV. Im Bereich von 28-29°C treten spontane Stromfluktuationen auf.

b) Spezifische Kapazität derselben Membran (gemessen mit der Meßanordnung von Bild 2.11b). Es tritt ein Kapazitätsabfall im Bereich von 27-29°C auf, also parallel zu den Stromfluktuationen von a).

der Kapazität um ca. 15% auf. Es decken sich also die Temperaturbereiche der kalorimetrisch gemessenen Phasenumwandlung, der spontanen Stromfluktuationen und des Kapazitätsabfalls. Dies gilt sowohl für den Abkühl- wie für den Aufheizvorgang. Es wird hierbei eine Hysterese von 2-3°C (Tabelle 2.1) beobachtet.

Auch mit 1,2-HTPC und 1,2-DPPC ließen sich planare Bilayer bei $T < T_c$ bilden, mit 1,2-DPPC jedoch nur bis zu Membrandurchmessern von ca. 5o µm. Die gemessenen Daten für 1,3-SMPC und 1,2-DPPC Membranen sind in Tabelle 3.1 angegeben.

Um einen möglichen, durch das Lösungsmittel der Lipidlösung bewirkten Effekt auf die Membraneigenschaften im festen oder fluiden Zustand zu bestimmen, wurde oberhalb T_c sofort nach Bilden des Bilayers die Kapazität in Abhängigkeit von der Zeit gemessen, dabei nahm diese innerhalb von 1-2 min den Endwert an. Bei Bilden des Bilayers unterhalb T_c war die Kapazität zunächst sehr klein und nahm dann innerhalb von 1o-15 min den Endwert an. Für 1,3-SMPC war der Endwert bei $T < T_c$ o,74 µF cm^{-2}, während der Anfangswert unterhalb T_c bei o,6 µF cm^{-2} lag. Weiterhin wurden nach der von Verger und Pattus (1o2) entwickelten Variante Monolayer aus lösungsmittelfreien Vesikeln hergestellt, indem die Vesikellösung vorsichtig auf die Elektrolytoberfläche gegeben wurde. Das Formen des Bilayers erfolgte wie oben beschrieben. Die Membranen verhielten sich gleichartig wie solche, die nach der Montal-Mueller-Technik hergestellt wurden. Die Kapazitätswerte waren oberhalb und unterhalb T_c im Rahmen der Meßgenauigkeit identisch. Unterhalb T_c waren jedoch Membranen, die aus einer Vesikel-Monolayerschicht entstanden, instabiler als solche, die noch Spuren von Lösungsmittel enthielten.

Ferner wurde untersucht, ob sich lösungsmittelhaltige Decan-Membranen nach der Mueller-Rudin-Technik auch unter-

Lipid	spez. Kapazität		spez. Leitfähigkeit	T_c
	$T < T_c$	$T > T_c$	$T \gtrless T_c$	
1,3-SMPC	(o,74 ± o,o5) µF cm^{-2}	(o,82 ± o,o5) µF cm^{-2}	(15 ± 1) nS cm^{-2}	29-31°C
1,2-DPPC	(o,6 ± o,2) µF cm^{-2}	(o,84 ± o,o5) µF cm^{-2}	(42 ± 5) nS cm^{-2}	4o-42°C

Tabelle 3.1

Spez. Kapazität und spez. Leitfähigkeit planarer Bilayer aus 1,3-SMPC und 1,2-DPPC bei $T < T_c$ und $T > T_c$. Als Membranfläche wurde stets die mikroskopisch vermessene Fläche des Septenloches eingesetzt.

Methode: Montal-Mueller

Lipidlösung: 5 mg/ml Lipid in Hexan/Ethanol (1o/1 - V/V)

Elektrolyt: 1 M KCl, pH 5,8

halb T_c bilden lassen. Stellt man eine Membran oberhalb T_c her und kühlt sie anschließend auf $T < T_c$ ab, so verhält sie sich qualitativ wie eine lösungsmittelfreie Membran, wobei jedoch die spezifische Kapazität geringer ist (ca. o,5 µF cm^{-2} bei 1,3-SMPC). Die spezifische Kapazität nimmt mit der Zeit geringfügig zu. Unterhalb T_c ließen sich nur "Membranen" mit sehr kleiner Kapazität herstellen, die vermuten lassen, daß ein dicker Tropfen des Lipid-Decan-Gemisches das Loch überspannt. Nach Aufheizen auf Temperaturen > T_c verhalten sich diese Membranen wie oben beschrieben. Eine geeignete Testprobe für das Vorhandensein bimolekularer Lipidmembranbereiche stellt die Alamethicin-Pore dar (s. Kap. 3.1.3.2). Das Auftreten von Alamethicin-Poren mit der bekannten Leitwertsequenz signalisiert die Existenz bimolekularer Bereiche. Über die Ausdehnung dieser Bereiche erhält man jedoch keine Aussage. Im Falle eines Lipid-Decan-Tropfens werden keine Alamethicin-Poren beobachtet.

3.1.2 Carriertransport

Die Zugabe von Ionencarriern wie Valinomycin zur Elektrolytlösung führt zu einer Erhöhung der Leitfähigkeit von Membranen um Größenordnungen (38). Im folgenden wird dargestellt, wie sich die Carrier-induzierte Leitfähigkeit in Abhängigkeit von der Temperatur im Bereich der Lipidphasenumwandlung verhält. Bild 3.2 zeigt die Abkühlkurve eines Valinomycin-dotierten 1,2-HTPC Bilayers in 1 M KCl Salzlösung. Im Bereich von 35 bis 28°C wird eine leichte Abnahme des Membranstromes pro Flächeneinheit bei konstanter Membranspannung in Abhängigkeit von der Temperatur beobachtet, was auf einen kleinen positiven Temperaturkoeffizienten in diesem Bereich zurückzuführen ist. Bei ca. 28°C tritt ein schwach ausgeprägtes Minimum auf, dem ein

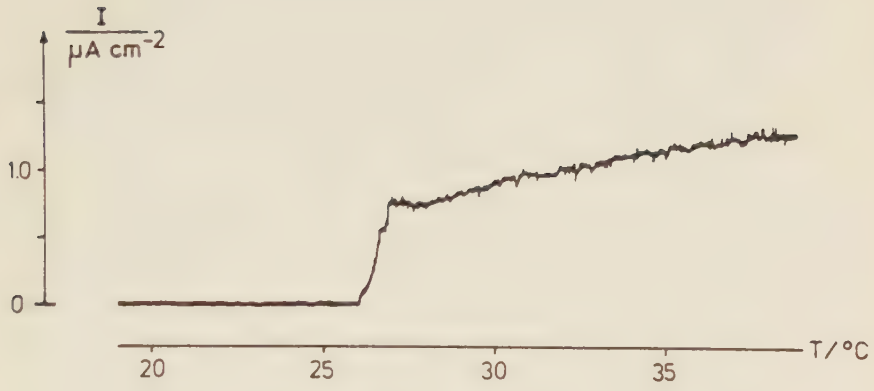


Bild 3.2
Abkühlkurve eines Carrier (Valinomycin)-dotierten 1,2-HTPC Bilayers
Montal-Mueller-Technik, Membranfläche: o,o2 mm², Salzlösung: 1 M KCl, pH 5,8; Abkühlrate: 1,5°C min^{-1}, Spannung: 5o mV, Carrier-Konzentration: 1 μg cm^{-3}.

Man findet eine kontinuierliche Abnahme der Membranleitfähigkeit, gemessen als über die Membran fließenden Strom bei konstanter Spannung, bis zu ca. 26°C gefolgt von einem steilen Abfall der Leitfähigkeit auf den Wert des undotierten Bilayers.

ebenfalls schwach ausgeprägtes Maximum folgt. Anschließend fällt der Membranstrom im Bereich von 27°C bis 26°C stark ab und nimmt ungefähr den Wert der Leitfähigkeit des undotierten Bilayers ein, der bei weiterer Temperaturerniedrigung konstant bleibt. Krasne, Eisenman und Szabo (22) haben ähnliche Effekte für Nonactin und Valinomycin bei ihren Experimenten mit einer Mischung aus Glyceryldipalmitat und Glyceryldistearat beobachtet. Vergleicht man die Kurven aus Bild 3.2 und Bild 3.1, so sieht man, daß der steile Stromabfall in der Nähe des Bereiches der spontanen Fluktuationen und der Kapazitätsänderung liegt, und zwar an der unteren Grenze dieses Bereiches.

Die Änderung des Membranstromes im gezeigten Beispiel beträgt ca. 3 Größenordnungen, und zwar von ca.1 $\mu A\ cm^{-2}$ auf 1 $nA\ cm^{-2}$. Aufheizkurven zeigen qualitativ das gleiche Verhalten, nur tritt die Leitfähigkeitsänderung bei einer um etwa 2°C - 3°C höheren Temperatur auf. Dies entspricht wiederum der Hysterese in den DSC-Kurven. An 1,3-SMPC Bilayern durchgeführte Messungen führen zu vergleichbaren Ergebnissen.

3.1.3 Porentransport

3.1.3.1 Gramicidin

Durch die Zugabe geringer Mengen Gramicidin A können ionenleitende Strukturen in planaren Bilayern induziert werden (41). Durch Dimerisierung zweier Gramicidin-Monomerer bilden sich membranüberspannende Poren. Krasne et al. (22) beobachteten bei ihren Messungen keinen Einfluß der Lipidphasenumwandlung auf die Leitfähigkeit eines Gramicidin-Vielporensystems. In diesem Kapitel werden detaillierte Messungen in einem sehr viel größeren Temperaturbereich um T_c beschrieben.

3.1.3.1 a Vielporensystem

Bild 3.3 zeigt die Temperaturabhängigkeit des Stromes pro cm^2 Membranfläche eines Gramicidin-Vielporensystems bei konstanter Spannung. Diese Stromspur unterscheidet sich schon qualitativ wesentlich von der des Carriersystems. Man findet einen geringen negativen Temperaturkoeffizienten von 35°C bis zu 23°C. Im Bereich der Phasenumwandlungstemperatur des reinen Lipids von 31°C bis 27°C ist keine signifikante Änderung des Verhaltens des Systems zu erkennen. Dies deckt sich mit den Messungen von Krasne et al. (22). Bei weiter abnehmender Temperatur treten jedoch signifikante Änderungen auf. Ab etwa 22°C fällt der Membranstrom mit abnehmender Temperatur ab. Es folgen ein Minimum bei ca. 21°C und ein schwach ausgeprägtes Maximum bei 19°C. Im Bereich von 17°C bis 16°C fällt dann der Strom sehr steil auf einen fast konstanten Endwert ab. Im gezeigten Beispiel liegt dieser Wert allerdings etwa zwei Größenordnungen höher als der Strom durch den reinen Bilayer (Kap. 3.1.1). Analog zu dem oben Gesagten sind auch hier bei Aufheizexperimenten alle Effekte um ca. 3°C zu höheren Temperaturen hin verschoben. Ein auffallender Befund ist, daß beim sprunghaften Abfall des Membranstromes auch die Breite des Stromrauschens um mindestens eine Größenordnung kleiner wird.

3.1.3.1 b Einzelporensystem

Um die im vorigen Abschnitt beschriebenen Effekte zu erklären, hat man zunächst davon auszugehen, daß sich die Leitfähigkeit vieler gleichzeitig fluktuierender Gramicidin-Poren als Superposition von Eigenschaften einzelner Poren darstellen läßt. Ein System isoliert beobachtbarer einzelner Poren ist durch eine Reihe von direkt meßbaren Parametern charakterisiert: den mittleren Leitwert Λ,

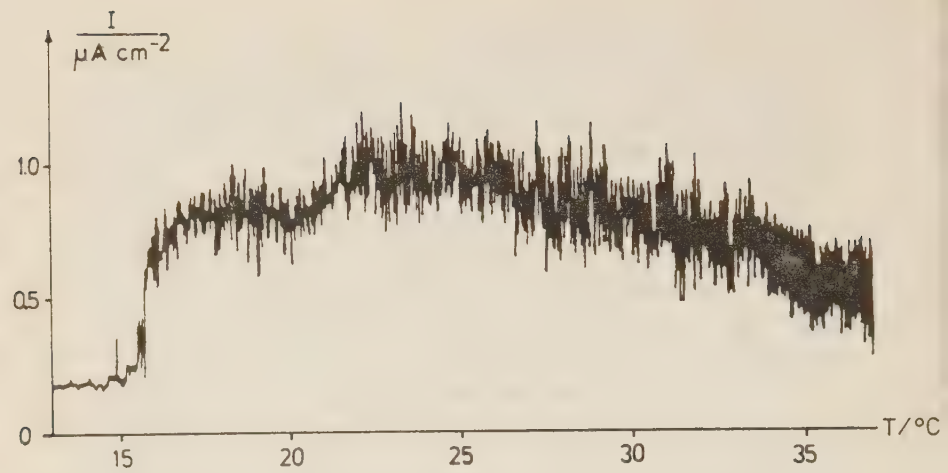


Bild 3.3
Abkühlkurve eines Gramicidin A-dotierten planaren Bilayers aus 1,3-SMPC
Montal-Mueller-Technik, Salzlösung: 1 M KCl, pH 5,8, Abkühlrate: 1,5°C min^{-1}, Gramicidin-Konzentration: o,1ng cm^{-3}, Spannung: 2o mV, Fläche: o,o2 mm^2.
Man findet einen leichten Anstieg des Stromes pro cm^2 Membranfläche, also der spezifischen Leitfähigkeit, von 37°C bis zu einem Maximum bei ca. 23°C. Es folgen ein schwaches Minimum und ein schwaches Maximum und anschließend ein steiler Abfall des Stromes bei ca. 16°C auf einen Wert, der jedoch erheblich über dem entsprechenden Stromwert der undotierten Membran liegt. Im Bereich der Hauptphasenumwandlung des reinen Lipids treten keine signifikanten Effekte auf. Gleichzeitig mit der sprunghaften Erniedrigung des Membranstromes bei 16°C geht das Stromrauschen stark zurück.

die mittlere Lebensdauer τ und die mittlere Anzahl von Porenereignissen pro sec, die mittlere Porenfrequenz f. In Bild 3.4 sind die Meßgrößen Λ, τ und f als Funktionen der Temperatur für Ereignisfolgen einzelner Gramicidin-Poren in 1,3-SMPC Membranen bei einer Elektrolytkonzentration von 2 M KCl dargestellt. Die Daten wurden durch stufenweises Abkühlen von drei verschiedenen Membranen gewonnen. Der mittlere Fehler der angegebenen Einzelwerte beträgt 5%. Bild 3.4 a) zeigt den mittleren Leitwert Λ in logarithmischem Maßstab aufgetragen gegen 1/T. Die experimentellen Daten lassen sich durch eine Geradenbeziehung beschreiben. Nach (52) erhält man entsprechend der Gleichung

$$E_A(\Lambda) = RT^2 \frac{d\ln\Lambda}{dT}$$

eine formale Aktivierungsenergie $E_A(\Lambda)$ von 16 kJ mol^{-1}. Die Temperaturabhängigkeit des Reziprokwertes der mittleren Lebensdauer τ ist in Bild 3.4 b) aufgezeigt. Die experimentellen Daten lassen sich bei der gewählten Auftragungsart durch zwei Geraden mit einem Schnittpunkt bei ca. 24°C anpassen. Für beide Geraden kann man mit der Beziehung

$$E_A(1/\tau) = RT^2 \frac{d\ln(1/\tau)}{dT}$$

für den entsprechenden Temperaturbereich folgende Aktivierungsenergien angeben:

$T < 24°C$ $\quad E_A(1/\tau) = 29$ kJ mol^{-1}

$T > 24°C$ $\quad E_A(1/\tau) = 78$ kJ mol^{-1}

Wegen der Unmöglichkeit, geringe Gramicidin-Konzentrationen reproduzierbar einzustellen, erfolgt die Auswertung der mittleren Porenfrequenz f(T) in Bezug auf den Wert f(2o°C) bei 2o°C. In Bild 3.4 c) ist das Verhältnis

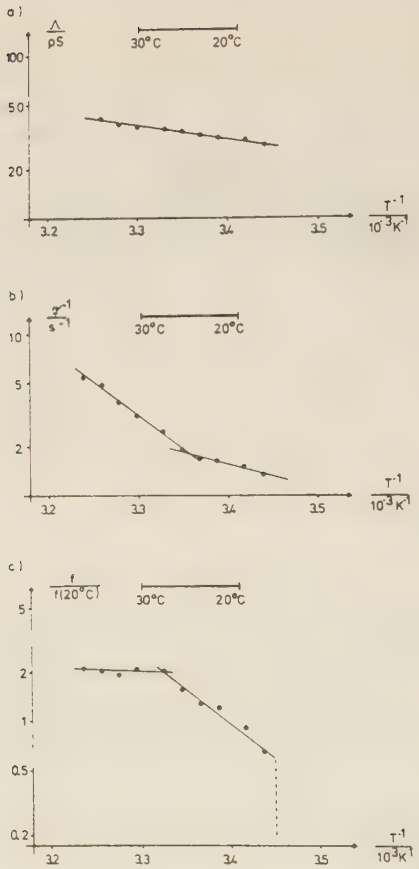


Bild 3.4

Die charakterisierenden Meßparameter von Folgen isolierter, einzelner Gramicidin-Poren in Abhängigkeit von der Temperatur im Bereich der Phasenumwandlung des verwendeten Lipids.

Dargestellt sind die Parameter: a) mittlerer Leitwert Λ, b) mittlere Lebensdauer γ und c) mittleres Porenfrequenzverhältnis f/f(2o°C).

Montal-Mueller-Membran aus 1,3-SMPC,5 mg/cm³ Lipid in Hexan/Ethanol (1o/1 - V/V), Salzlösung: 2 M KCl ungepuffert, pH 5,8, Gramicidin-Konzentration: 1 pg/cm³, Fläche der Membran: o,o2 mm², Membranspannung: 5o mV - 1oo mV

$f/f(2o°C)$ in logarithmischem Maßstab gegen $1/T$ aufgetragen. Auch hier lassen sich die experimentellen Daten durch zwei Geraden anpassen. Während für $T > 27°C$ eine nahezu konstante Porenfrequenz beobachtet wird, findet für $T < 27°C$ eine starke Abnahme von f mit einer formalen Aktivierungsenergie $E_A(f) = 67\ kJ\ mol^{-1}$ statt (Die Definition von $E_A(f)$ entspricht der von $E_A(\Lambda)$).

Um zu einem Vergleich der Vielporen- und Einzelporendaten zu gelangen, sind in Bild 3.5 zwei sich entsprechende, relativierte Datensätze eingezeichnet. Die durchgezogene Kurve wurde aus Bild 3.3 durch Verhältnisbildung $I(T)/I(T(2o°C))$ gewonnen. Die ausgefüllten Punkte entsprechen den Werten, die man aus Bild 3.4 a)-c) erhält, wenn man die mittlere Leitfähigkeit λ des Einzelporensystems berechnet und auf den Wert bei 2o°C bezieht. λ ist gegeben durch das Produkt

$$\lambda = f \cdot \Lambda \cdot \gamma$$

Daraus folgt die relativierte Meßgröße

$$\frac{\lambda(T)}{\lambda(2o°C)} = \frac{f(T)}{f(2o°C)} \cdot \frac{\Lambda(T)}{\Lambda(2o°C)} \cdot \frac{\gamma(T)}{\gamma(2o°C)}$$

Bild 3.5 zeigt, daß die Punkte der Einzelporendaten qualitativ mit der ausgezogenen Kurve in Übereinstimmung stehen. Das Maximum bei 23°C bei den Vielporenmessungen scheint bei den Einzelporenmessungen um 2-3°C zu höheren Temperaturen hin verschoben.

Der zusätzliche Effekt der sprunghaften Leitfähigkeitserniedrigung in Bild 3.3 bei ca. 16°C entspricht der Beobachtung, daß die Porenfrequenz bei ca. 16°C praktisch zu Null wird. Für die Bilder 3.4 und 3.5 liegen daher ab ca. 17°C keine Daten mehr vor. In diesem Bereich werden häufig instabile Porenzustände angenommen. Diese Ereignisse sind dadurch charakterisiert, daß die einer offenen

Pore entsprechenden Stromniveaus starken Schwankungen unterworfen sind. Dieses Phänomen ist in Bild 3.6 dargestellt, das im Vergleich Spuren von Gramicidin-Einzelporenfluktuationen in 1,3-SMPC bei 3o°C (a), 2o°C (b) und bei 16°C (c) zeigt. Zusätzlich treten bei niedrigen Temperaturen vereinzelt Poren extrem langer Lebensdauer auf, die von der Auswertstatistik nicht erfaßt wurden.

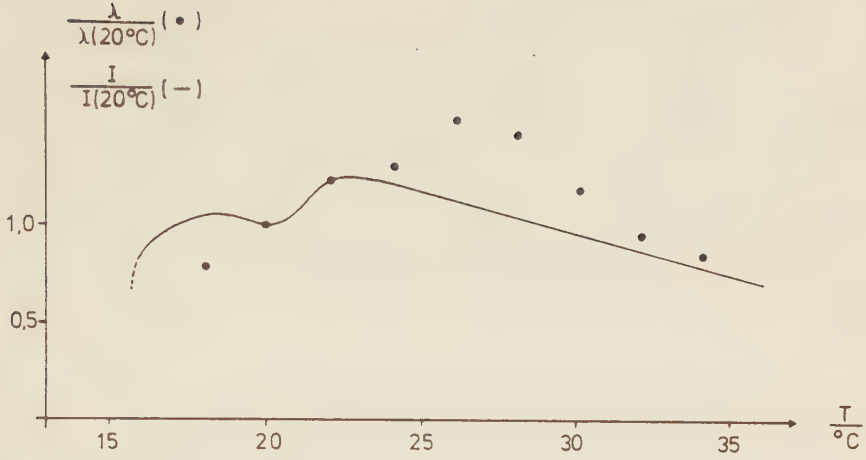


Bild 3.5

Vergleich der Vielporendaten (Bild 3.3) und der Einzelporendaten (Bild 3.4). Die durchgezogene Linie gibt das Verhältnis des Membranstromes (Vielporensystem, 2o mV) bezogen auf den Wert bei 2o°C an: I(T)/I(T(2o°C)). Die gefüllten Punkte wurden durch Produktbildung (Einzelporensystem) $\mathfrak{L} = f \cdot \Lambda \cdot \gamma$ und anschließende Relativierung infolge Division durch $\mathfrak{L}(2o°C) = f(2o°C) \cdot \Lambda\,(2o°C) \cdot \gamma\,(2o°C)$ gewonnen.

Bild 3.6
Gramicidin-Einzelporenfluktuationen in 1,3-SMPC bei verschiedenen Temperaturen. a) 3o°C, b) 2o°C, c) 16°C. Während bei 3o°C und 2o°C stabile Stromniveaus bei offenen Poren sichtbar sind, treten im Bereich von 16°C starke Schwankungen dieser Stromniveaus auf.
Salzlösung: 2 M KCl, pH 5,8, Gramicidin-Konzentration: 1 pg/cm³, Fläche der Membran: o,o2 mm², Membranspannung: 5o - 1oo mV.

3.1.3.2 Alamethicin

In Kapitel 1.4.2 sowie im Anhang (Kap.6.2) wurde Alamethicin als spannungsabhängiger Porenbildner kurz charakterisiert (48-56). Im folgenden werden Ergebnisse präsentiert, die die Eigenschaften der Alamethicin-Pore im Bereich und unterhalb der Phasenumwandlungstemperatur des reinen Lipids betreffen. Die Messungen wurden im allgemeinen mit der Al-3o-Komponente durchgeführt. Bei entsprechenden Experimenten mit der Al-5o-Komponente (5o,6o) wurden vergleichbare Ergebnisse erhalten.

3.1.3.2. a Vielporensystem

Zur Kontrolle und zum Vergleich mit den Literaturdaten (52) wurde die Konzentrationsabhängigkeit der Al-induzierten Leitfähigkeit in planaren 1,3-SMPC Membranen oberhalb T_c (bei 35°C) untersucht. Bild 3.7 zeigt die Abhängigkeit des Membranstromes von der Al-Konzentration bei konstanter Membranspannung U=5o mV in doppellogarithmischer Auftragung. Die Abhängigkeit der Leitfähigkeit eines Alamethicin-dotierten Bilayers von der Temperatur bei Konstanthalten aller anderen Parameter ist in Bild 3.8 gezeigt. Aufheiz- und Abkühlkurve zeigen dabei keine signifikanten Unterschiede. Beide haben ein ausgeprägtes Maximum bei 23°C-24°C. Dies bedeutet einen negativen Temperaturkoeffizienten oberhalb und einen positiven Temperaturkoeffizienten unterhalb von ca. 23°C. Wie man sieht, ist in Bild 3.8a bei den gegebenen Bedingungen oberhalb von 34°C keine Pore geöffnet. In Bild 3.8b bei höherer Al-Konzentration ist die Porenfrequenz in diesem Bereich sehr klein. Es folgt jeweils ein steiler Leitfähigkeitsanstieg zu niedrigen Temperaturen hin. Die Steilheit des Anstiegs war zum einen von den äußeren Parametern wie Spannung und Konzentration des Peptids abhängig, variierte aber auch unter konstanten Bedingungen sehr stark. Häufig war der Anstieg der Leitfähigkeit

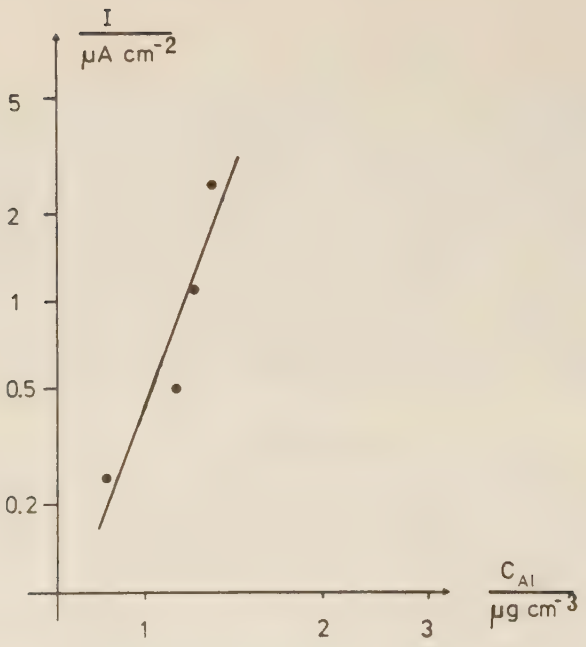


Bild 3.7

Konzentrationsabhängigkeit der Al - 3o - induzierten Leitfähigkeit eines 1,3-SMPC Bilayers.
Temperatur: 35°C, Salzlösung: 1 M KCl, pH 5,8;
Membranfläche: 0,02 mm²
Die Stromwerte wurden bei U=5o mV den Strom-Spannungskennlinien bei der jeweiligen Konzentration entnommen.
Mit dem Ansatz: $I (C_{Al}) = A \cdot C_{Al}^{\alpha}$ und der doppelt-log. Darstellung $\lg I = \lg A + \alpha \cdot \lg C_{Al}$ folgt aus der Steigung der Geraden: $\alpha = 6,5$.

so drastisch bei Erniedrigung der Temperatur, daß er zur Zerstörung der Membran führte. Es war daher schwierig, die Temperatur in einem Versuch über den angegebenen Bereich zu ändern. Auf das Maximum folgt ein steiler Abfall der Leitfähigkeit von 23°C bis etwa 19°C, wo die Leitfähigkeit einen konstanten Wert annimmt. Es war nicht möglich, in Vielporenexperimenten unter den angegebenen Bedingungen die Temperatur weiter zu erniedrigen, ohne die Membran zu zerstören. Wurde die Membran bei 14°C gebildet, so beobachtete man in diesem Bereich eine sehr niedrige Porenfrequenz. Beim Aufheizvorgang erfolgte dann ein steiler Leitfähigkeitsanstieg bis zu ca. 19°C. Es bildete sich dort eine Schulter aus. Bei weiterem Aufheizen trat ein weiterer Leitfähigkeitsanstieg bis zum Maximum bei ca. 24°C auf. Danach fiel die Leitfähigkeit wieder steil ab bis auf das Niveau von Einzelporenfluktuationen bei etwa 33°C-35°C.

Zusätzlich wurde die Abhängigkeit von Strom-Spannungskennlinien (47,51,52) bei konstanter Al-Konzentration von der Temperatur untersucht. Bild 3.9a zeigt in einem dreidimensionalen Diagramm die Abhängigkeit des Membranstromes von Temperatur und Membranspannung. Die Strom-Spannungskennlinien wurden während eines langsamen Abkühlvorganges mit ca. 1o s andauernden Sägezahn-Spannungspulsen an einer Membran aufgenommen. Zwischen den Spannungspulsen befand sich die Membran im spannungsfreien Zustand. In Bild 3.9b ist der Strom bei konstanter Spannung(U=75 mV) in Abhängigkeit von der Temperatur aufgetragen. Diese Kurve entspricht genau Bild 3.8a. Man sieht hier ebenso das Auftreten eines Strommaximums bei ca. 24°C. In einer Reihe von Abkühlexperimenten unter identischen Bedingungen wurde beobachtet, daß der Leitfähigkeitsanstieg beim Durchkühlen stark von der Größe des gewählten, konstanten Spannungswertes abhängt. Bei sehr niedrigen Temperaturen $T \leq 1o°C$ können keine Strom-Spannungskennlinien des Al-

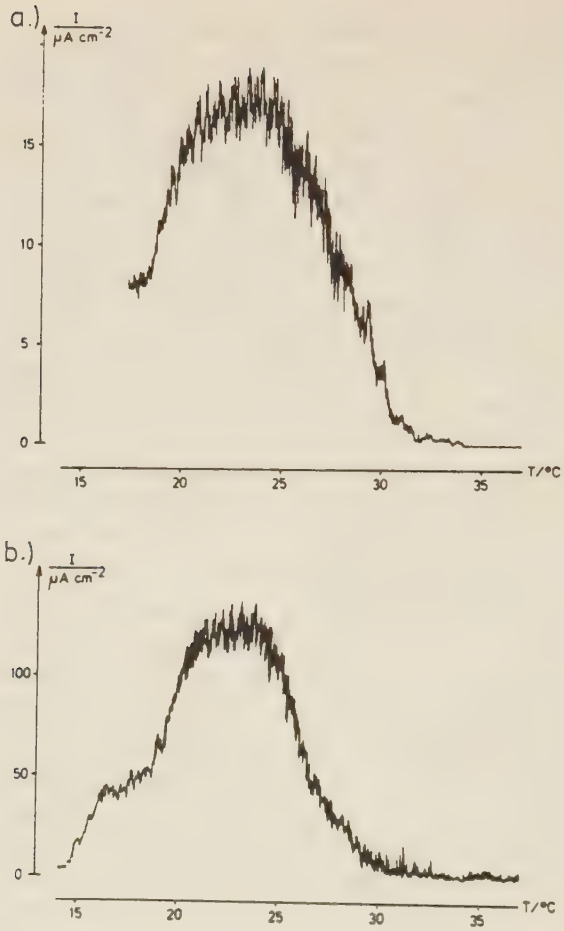


Bild 3.8

a) Abkühl- und b) Aufheizkurve eines Al - 3o - dotierten planaren Bilayers aus 1,3-SMPC. Montal-Mueller-Technik; Salzlösung: 1M KCl, pH 5,8, Membranspannung: 5o mV, Abkühlrate: 1,5°C min^{-1}, Fläche: 0,02mm², Alamethicinkonzentration: a) 0,2µg cm^{-3}, b) 1µg cm^{-3}. Beide Kurven zeigen qualitativ das gleiche Verhalten. Eine Hysterese ist nicht erkennbar. Es tritt ein ausgeprägtes Maximum bei ca. 24°C auf und eine Schulter bei ca. 18°C. Es gelang nicht, den Bilayer kontinuierlich unter 17°C abzukühlen, ohne ihn zu zerstören.

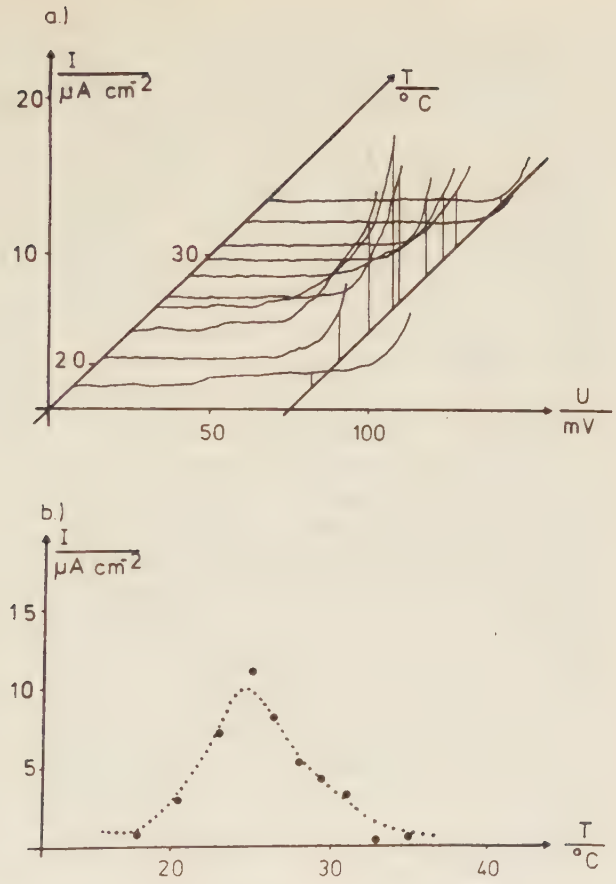


Bild 3.9

Abhängigkeit der Strom-Spannungskennlinie eines Al-3o-dotierten 1,3-SMPC Bilayers von der Temperatur. Die Kennlinien wurden an einer Membran während des Abkühlvorgangs mit ca. 1o s andauernden Sägezahn-Spannungspulsen aufgenommen.
Salzlösung: 1M KCl, pH 5,8, Fläche=0,02mm², C_{Al}: 0,1 µg/cm³
a) zeigt den positiven Ast der jeweiligen Strom-Spannungskennlinie bei verschiedenen Temperaturen
b) zeigt den aus a) übertragenen Membranstrom als Funktion der Temperatur bei konstanter Spannung (U=75mV). Dieses Bild entspricht der Kurve in Bild 3.8a.

-Porensystems mehr gewonnen werden, da hier die Membranleitfähigkeit bei höheren Spannungen nicht reproduzierbar sprunghaft und teilweise irreversibel zunimmt.

Die Spannungsabhängigkeit der Eigenschaften von Alamethicin-Poren ermöglicht es, Spannungssprung-Stromrelaxationsexperimente zur Untersuchung der Kinetik von Porenbildung und -zerfall durchzuführen (52). Bild 3.1c zeigt Stromrelaxationskurven bei verschiedenen Temperaturen. Die Anstiegszeiten sind nur bei nahezu identischen Stromendwerten vergleichbar (52). Diese wurden gewonnen über eine kompensatorische Wahl von Membranspannung und Al-Konzentration. Bild 3.1c zeigt drei Kurven für $T > T_c$, $T \approx T_c$ und $T < T_c$. Während die Auswertung für $T > T_c$ und $T < T_c$ jeweils nur eine Relaxationszeit 1. Ordnung ergibt, läßt die Relaxationskurve im Bereich $T \approx T_c$ das Vorhandensein zweier Relaxationsprozesse 1. Ordnung vermuten. Der Effekt des Auftretens einer zweiten, sehr langsamen Relaxation im Bereich $T \approx T_c$ wird in einem gesonderten Kapitel beschrieben (s.Kap. 3.1.3.2c). In Bild 3.11 ist die Abhängigkeit der (schnelleren) Relaxationszeit τ_R von der Temperatur dargestellt. τ_R nimmt mit abnehmender Temperatur stark zu. Die halblogarithmische Auftragung von $^1/\tau_R$ gegen $^1/T$ ergibt eine Gerade, deren Steigung durch eine formale Aktivierungsenergie von $E_A(^1/\tau_R) = 141\ kJ\ mol^{-1}$ charakterisiert ist.

3.1.3.2 b Einzelporensystem

Die Alamethicin-Pore zeigt eine wohl definierte Leitwertsequenz, wobei die Niveauleitwerte nicht ganzzahlige Vielfache voneinander sind (49,5c,103). Daraus folgt, daß zur genauen Charakterisierung der Eigenschaften der Alamethicin-Pore eine Vielzahl von Parametern erforderlich ist. Da im Rahmen dieser Arbeit keine detaillierte Ana-

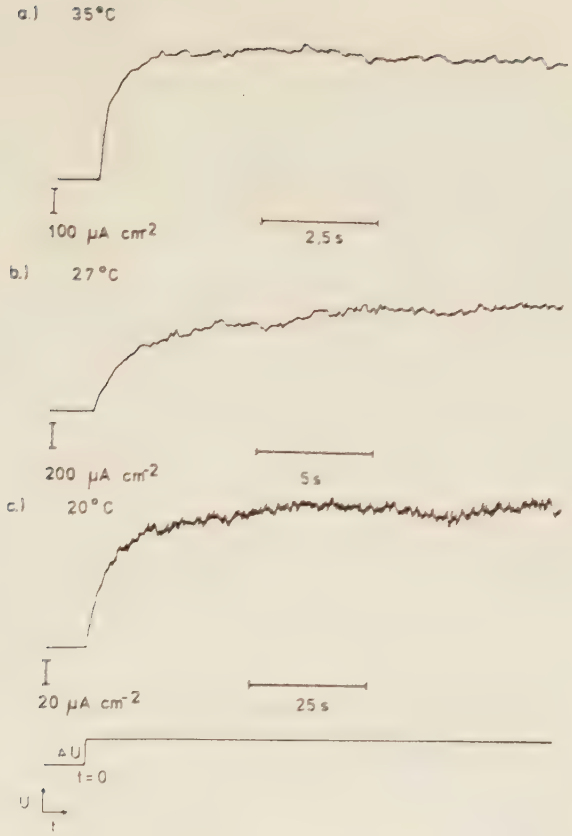


Bild 3.1o

Spannungssprung-Stromrelaxationsexperimente mit Alamethi-cin-dotierten 1,3-SMPC Bilayern bei verschiedenen Temperaturen

Salzlösung: 1 M KCl, pH 5,8, Membranfläche: o,o2 mm², Al-3o-Konzentration: o,2 µg/cm³. Spannungssprung von U= o mV auf a), b) U= 1oo mV, c) U= 5o mV.

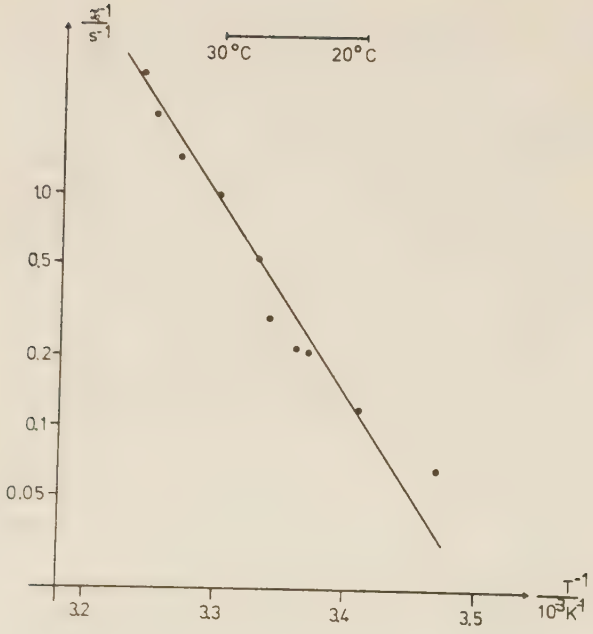


Bild 3.11

Temperaturabhängigkeit der inversen Zeitkonstante τ_R^{-1} von Stromrelaxationskurven nach einem Spannungssprung. Als konstante Bezugsleitfähigkeit wurde Λ = 5 mS cm^{-2} ± 10% gewählt. Details sind im Text beschrieben.
Salzlösung: 1 M KCl, pH 5,8, Membranfläche: 0,02 mm², Al-3o-Konzentration: 0,1 - 0,4 µg/cm³, Membranspannung (Endwert): 50 - 100 mV.

lyse des Al-Systems durchgeführt werden sollte, wurden einige Parameter ausgewählt, die das Verhalten des Porensystems ausreichend beschreiben. Es sind dies: die Niveauleitwerte Λ_ν, das mittlere Niveau $\overline{\nu}$, die mittlere Lebensdauer τ_ν der zwei wahrscheinlichsten Niveaus, sowie die mittlere Lebensdauer τ_p der Pore selbst und die Häufigkeit von Porenereignissen pro s, die Porenfrequenz f . In Tabelle 3.2 sind die Zustandsleitwerte und die Leitwertverhältnisse für Al-3o-Poren in 1,3-SMPC und 1,2-HTPC angegeben. Die Temperaturabhängigkeit der Leitwerte des 4. und 5. Niveaus in Bild 3.12b zeigt, daß im Temperaturbereich von 15-35°C kein gesonderter Effekt gefunden wird. Die in das Bild eingezeichnete Gerade entspricht einer formalen Aktivierungsenergie von $E_A\ (\Lambda_4,\Lambda_5) = 25\ kJ\ mol^{-1}$.

Bild 3.12a zeigt die Änderung des mittleren Zustandes von Alamethicin-Poren bei Veränderung der Temperatur. Der mittlere Zustand $\overline{\nu}$ ist definiert durch

$$\overline{\nu} = \sum_{\nu=0}^{\infty} p_\nu \nu ,$$

wobei p_ν die Aufenthaltswahrscheinlichkeit der Pore für das ν-te Niveau ist. Es wurde bei jedem Meßpunkt über 5o-7o Porenereignisse gemittelt, wobei jedoch selten auftretende sehr lang andauernde Poren, die während ihrer Öffnungszeit durch sehr viel mehr als 5oo Zustände fluktuierten, nicht berücksichtigt wurden, da sie den Charakter einer Fluktuationsspur stark bestimmt hätten. Dies gilt insbesondere für den Bereich der Lipidphasenumwandlungstemperatur (s.Kap.3.1.3.2c). Es ist eine Verschiebung des mittleren Zustandes von $\overline{\nu}$ =4 bei 3o°C zu $\overline{\nu}$ =5,5 bei 15°C in Bild 3.12a zu sehen.

Die mittlere Lebensdauer τ_ν der häufigsten Niveaus ν =4 und ν =5 ist als inverse Größe halblogarithmisch

1,3-SMPC			1,2-HTPC	
Λ_γ /pS	$\frac{\Lambda_{\gamma+1}}{\Lambda_\gamma}$	γ	Λ_γ /pS	$\frac{\Lambda_{\gamma+1}}{\Lambda_\gamma}$
21	-	1	16	-
22o	1o,5	2	18o	11,2
1ooo	4,5	3	8oo	4,4
23oo	2,3	4	17oo	2,1
36oo	1,6	5	28oo	1,6
49oo	1,4	6	39oo	1,4

Tabelle 3.2

Niveauleitwerte und Leitwertverhältnisse von Alamethicin R_F3o-Poren in 1,3-SMPC und 1,2-HTPC

Salzlösung: 1M KCl, pH 5,8
Temperatur: 24°C
Methode: Montal-Mueller, 5 mg/ml Lipid in Hexan/Ethanol (1o/1 - V/V)
Spannung: 5o mV - 1oo mV

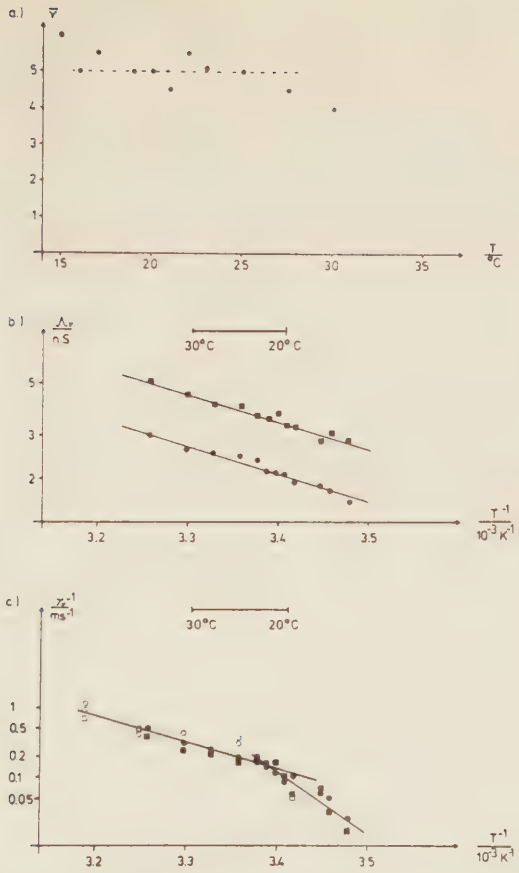


Bild 3.12

Charakterisierende Eigenschaften der Zustände von Al-3o-Poren in 1,3-SMPC in Abhängigkeit von der Temperatur

a) mittleres Niveau $\overline{\nu}$

b) mittlerer Leitwert Λ_ν für die wahrscheinlichsten Zustände ν =4 (●), ν = 5 (■)

c) mittlere Lebensdauer τ_ν für die wahrscheinlichsten Zustände ν =4 (●,o), ν =5(■,□). Die ausgefüllten Symbole beziehen sich auf eigene Messungen, die offenen Symbole auf Nachmessungen in der Arbeitsgruppe (S. Gelfert, S. Überschär, H.U. Wilmsen).

Montal-Mueller-Membranen aus 1,3-SMPC
5mg cm^{-3} Lipid in Hexan/Ethanol (2o/1 - V/V), Salzlösung: 1M KCL,pH 5,8, Membranfläche:o,o2 mm^2, Alamethicinkonzentration: ~ $2 \cdot 1o^{-8}$ g cm^{-3}

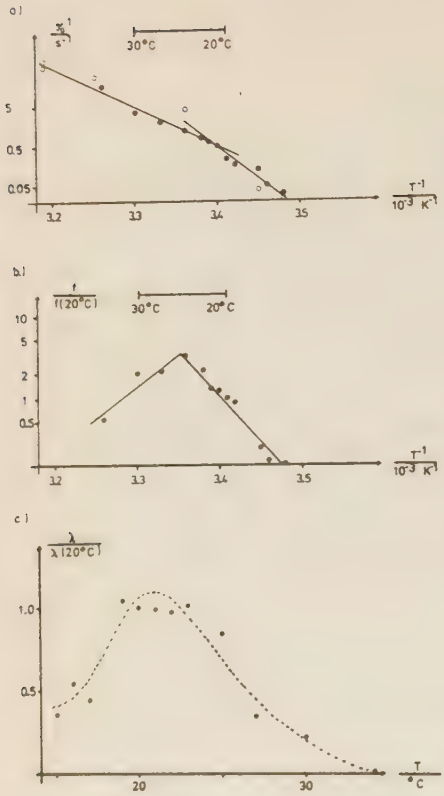


Bild 3.13

Charakterisierende Eigenschaften von Al-3o-Poren in 1,3-SMPC in Abhängigkeit von der Temperatur

a) mittlere Porenlebensdauer τ_p. Die ausgefüllten Symbole beziehen sich auf eigene Messungen, die offenen Symbole auf Nachmessungen in der Arbeitsgruppe (s. Bild 3.12).

b) mittlere Porenfrequenz f . Die Daten wurden aus vier verschiedenen Abkühlexperimenten gewonnen und in Relation zur Porenfrequenz f(2o°C) bei 2o°C gesetzt.

c) Berechnung der Leitfähigkeit eines Al-3o-dotierten Bilayers auf der Basis von Einzelporenfolgen entsprechend der Beziehung $\lambda = f \cdot \tau_p \cdot \Lambda_5$ in Relation zu λ (2o°C). Details sind im Text beschrieben

Montal-Mueller-Membran aus 1,3-SMPC
5 mg cm^{-3} Lipid in Hexan/Ethanol (2o/1 - V/V), Salzlösung: 1M KCl, pH 5,8, Membranfläche o,o2mm², Alamethicinkonzentration: $\sim 2 \cdot 1o^{-8}$ g cm^{-3}

gegen $^{1}/T$ in Bild 3.12c aufgetragen. Die Streuung der jeweiligen experimentellen Mittelwerte zeigt, daß keine systematische Abhängigkeit der τ_V von der Niveauzahl besteht. Die Datenpunkte lassen sich durch zwei Geraden annähern, wobei der Geradenschnittpunkt bei T=22°C liegt. Die Berechnung der formalen Aktivierungsenergien liefert $E_A\ (^{1}/\tau_V) = 71\ kJ\ mol^{-1}$ für T> 22°C und

$$E_A\ (^{1}/\tau_V) = 157\ kJ\ mol^{-1} \text{ für } T< 22°C$$

In Bild 3.13 ist die Temperaturabhängigkeit der Meßgrößen Porenlebensdauer τ_P und Porenfrequenz f aufgezeigt. Die halblogarithmische Auftragung von τ_P^{-1} gegen $^{1}/T$ (Bild 3.13a) legt auch hier eine Beschreibung der experimentellen Daten durch zwei Geraden mit einem Schnittpunkt bei 21°C nahe. Die entsprechenden formalen Aktivierungsenergien sind $E_A\ (^{1}/\tau_P) = 182\ kJ\ mol^{-1}$, T > 21°C,

$E_A\ (^{1}/\tau_P) = 315\ kJ\ mol^{-1}$, T< 21°C.

Die Daten für die Porenfrequenz f wurden aus vier verschiedenen Abkühlexperimenten gewonnen. Hierbei wurden, wie stets in diesem Kapitel, die sehr langen Al-Poren nicht berücksichtigt (s. Kap. 3.1.4). Da die absolute Zahl von f bei den verschiedenen Experimenten unterschiedlich war, wurden die Daten auf den Wert f (2o°C) bei 2o°C bezogen. Bild 3.13b zeigt ein ausgeprägtes Maximum bei ca. 26°C. Die in halblogarithmischer Auftragung von f /f (2o°C) gegen $^{1}/T$ dargestellte Funktion zeigt ein Anwachsen der Porenfrequenz im Temperaturbereich 15°C-26°C mit einer formalen Aktivierungsenergie E_A (f) = 211 kJ mol^{-1}. Für T> 26°C nimmt die Porenfrequenz mit wachsender Temperatur ab. In der Diskussion wird versucht, eine Erklärung für diesen Effekt des negativen Temperaturkoeffizienten zu geben.

Es wurde auch beim Alamethicin der Versuch gemacht, die Leitfähigkeit des Vielporensystems aus Größen der Einzelporenmessungen anzunähern. Die in einem Bilayer durch

Al-3o-induzierte Leitfähigkeit λ auf der Basis von Einzelporenfluktuationen ist gegeben durch $\lambda = f \cdot \gamma_p \cdot \overline{\Lambda}$, wobei $\overline{\Lambda}$ den mittleren Leitwert einer Al-Pore darstellt. Bild 3.12a zeigt, daß im Temperaturbereich $17°C < T < 3o°C$ recht gut $\overline{\gamma} \approx 5$ im Rahmen der experimentellen Schwankungen gilt. Somit wird als Näherung $\overline{\Lambda} = \Lambda_5$ angesetzt. Die Temperaturabhängigkeit des Verhältnisses $\lambda / \lambda(2o°C)$ zeigt Bild 3.13c. Ein ausgeprägtes Maximum wird bei $T = 22°C$ beobachtet.

Genau wie beim Gramicidin wurde auch hier beobachtet, daß die Porenniveaus dazu neigten, unterhalb einer bestimmten Temperatur, hier etwa 12°C, instabil zu werden. Wurde in solchen Fällen die Membranspannung erheblich erhöht ($U > 1oo$ mV), so konnte damit manchmal eine Stabilisierung erreicht werden. Gleichzeitig ging damit eine Verkürzung der Niveau- und Porenlebensdauern einher.

3.1.3.2c Das Auftreten eines zweiten Porentyps

Beobachtet man Alamethicin-Einzelporenfluktuationen in 1,3-SMPC Membranen im Bereich von 25°C bis 3o°C, so treten regelmäßig Effekte auf, wie sie in Bild 3.14 gezeigt werden. Man findet Poren extrem langer Lebensdauer mit einem optischen Erscheinungsbild der Zustandsfluktuationen, welches anders geartet ist als das bisher bekannte. Es treten "stabilisierte" Zustandsniveaus auf. Dabei springt das System vielfach kurzzeitig zum nächst höheren Niveau und zurück. Dann tritt eine sprunghafte Änderung um ein oder zwei Niveaus auf, wobei der Aufenthalt in diesem neuen Niveau wiederum durch kurze Übergänge zum nächst höheren und zurück unterbrochen wird. Dieser Effekt ist hauptsächlich beschränkt auf den Temperaturbereich der Phasenumwandlung des reinen Lipids. Man findet gleiche Effekte auch bei Bilayern aus 1,2-DPPC und

1,2-HTPC. Bild 3.14 zeigt im Vergleich typische Einzelporenfluktuationen bei drei verschiedenen Temperaturen: Bild 3.14a) zeigt eine Spur von Einzelporenfluktuationen bei 33°C. Hier tritt im allgemeinen einheitlich dieser Porentyp auf. Bild 3.14b) zeigt in gleicher hoher zeitlicher Auflösung schnelle Porenzustandsfluktuationen, die bei 27°C beobachtet werden. Eine Reduktion der zeitlichen Auflösung dieser Fluktuationen in Bild 3.14c) läßt jedoch die Existenz eines anomalen Porentyps mit extrem langer Lebensdauer erkennen: Als zusätzliches Charakteristikum treten bevorzugt schnelle Übergänge zwischen zwei benachbarten Niveaus auf. Neben diesem anomalen Porentyp treten Poren kürzerer Lebensdauer auf, die in ihrem Erscheinungsbild der Fluktuationsspur in a) ähneln. Bei 21°C schließlich (Bild 3. 14d)) tritt wiederum nur ein Porentyp auf. Trägt man die Porenlebensdauer τ_p in Abhängigkeit von der Temperatur auf, wie in Bild 3.13a) geschehen, so wird ersichtlich, daß sich der Porentyp in a), der kurzlebige Porentyp unter den Bedingungen von b) und c) und der Porentyp in d) entsprechen. Der zusätzlich auftretende Porentyp ist der anomal langlebiger Poren, die bevorzugt im Temperaturbereich der Lipidphasenumwandlung beobachtet werden. Die mittlere Lebensdauer dieser anomalen Poren beträgt $\tau_p^* \approx 1o$ s. Die mittlere Zustandslebensdauer τ_ν^* der Zustände $\nu = 4$ und $\nu = 5$ liegt mit $\tau_\nu^* = 5$ ms jedoch im gleichen Zeitbereich wie die mittleren Zustandslebensdauern der kurzlebigen Poren. Ein Vergleich der Lebensdauerdaten von kurzlebigen und anomal langlebigen Poren ist in Tabelle 3.3 aufgeführt.

Eine Aussage über die Signifikanz und Häufigkeit des anomalen Porentyps gegen Spannungssprung-Stromrelaxationsexperimente an Al-3o-Vielporensystemen. Bild 3.15a)(s. auch Bild 3.1ob)) zeigt, daß man im Temperaturbereich der Lipidphasenumwandlung tatsächlich einen zweiten, sehr langsamen Anstieg des relaxierenden Stromes beobachtet. In einer halblogarithmischen Auftragung der Stromdifferenz

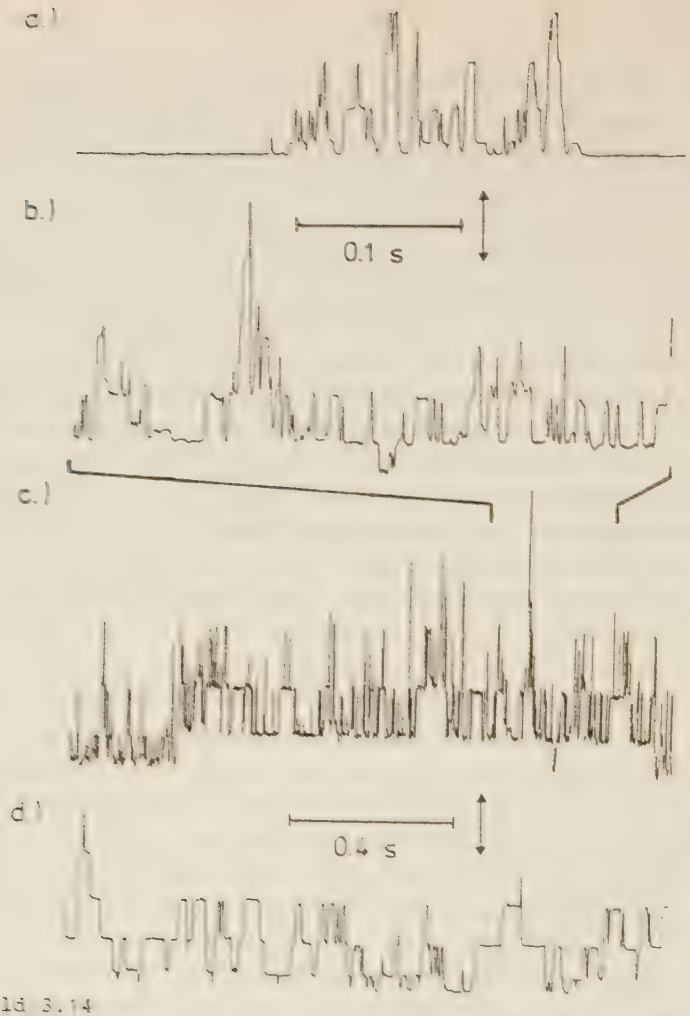


Bild 3.14

Auftreten zweier unterschiedlicher Porenpopulationen im Bereich der Phasenumwandlungstemperatur des reinen Lipids

Montal-Mueller-Membran, Fläche: 0,02 mm², Lipidlösung: 5 mg ml⁻¹ SMPC in Hexan/Ethanol (2o/1- V/V) Alamethicinkonzentration: 0,01 µg cm^{-3}, Salzlösung: 1M KCl, pH 5,8, Spannung: 5o mV - 1oo mV.

a.) 33°C, b.) u. c.) 27°C, d.) 21°C

kurzlebiger Porentyp	τ_r = 35 ms^{+}	τ_P = 0,4 s^{++}	τ_R = 1,9 s^{+++}
langlebiger Porentyp	τ_r^* ≈ 5 ms	τ_P^* ≈ 10 s	τ_S ≈ 20 s

Tabelle 3.3

Vergleich der Lebensdauerdaten der zwei Al-3o-Porentypen im Bereich der Temperatur der Lipidphasenumwandlung. Die Werte für den kurzlebigen Typ wurden den folgenden Diagrammen entnommen:

$^{+}$Lebensdauer τ_r des 4. bzw. 5. Porenzustandes aus Bild 3.12c

$^{++}$ Porenlebensdauer τ_P aus Bild 3.13 a

$^{+++}$ schnelle Relaxationszeit τ_R aus Bild 3.11.

Details über die Bestimmung der entsprechenden Größen des langlebigen Porentyps τ_r^* , τ_P^* und τ_S sind im Text beschrieben.

Methode: Montal-Mueller Technik
Lipid: 5 mg/ml 1,3-SMPC in Hexan/Ethanol (1o/1 - V/V)
Salzlösung: 1M KCl, pH 5,8
Temperatur: 27°C

$I(t \rightarrow \infty) - I(t)$ gegen die Zeit t lassen sich diese Kurven durch zwei Geraden darstellen. Durch Differenzbildung sind die Relaxationsamplituden des schnellen und des langsamen Prozesses zu berechnen. Die Ergebnisse sind konsistent mit den im vorigen Kapitel dargelegten Daten. Die schnelle Relaxationszeit τ_R entspricht den normalen kurzlebigen Poren, während die langsame Relaxationszeit mit $\tau_S > 2o$ s den anomal langlebigen Poren zu entsprechen scheint (s. Tabelle 3.3). Darüberhinaus zeigt die Auswertung des Amplitudenverhältnisses, Stromamplitude A_S des langsamen Prozesses dividiert durch die Summe der Stromamplituden des langsamen A_S und des schnellen Prozesses A_R in Bild 3.16, daß eine meßbare langsame Stromrelaxation nur im Bereich von 24-3o°C auftritt. Das Auftreten des anomal langlebigen Porentyps ist somit auf den Bereich der Lipidphasenumwandlung beschränkt. Das Maximum in Bild 3.16 liegt bei ca. 27°C.

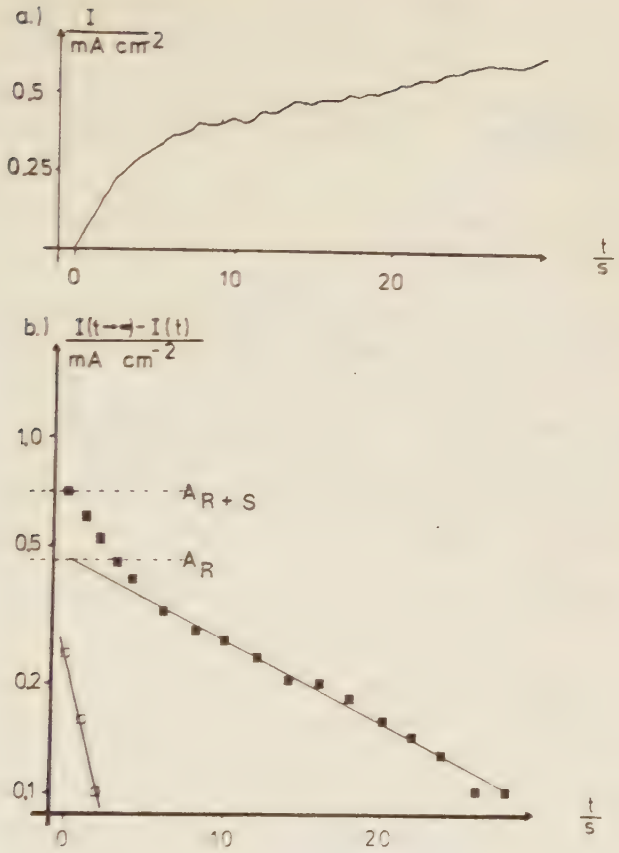


Bild 3.15

Spannungssprung-Stromrelaxationsexperiment mit einem Al-3o-dotierten Bilayer aus 1,3-SMPC im Bereich der Phasenumwandlungstemperatur des reinen Lipids. Die halblogarithmische Auftragung (b) der Relaxationskurve (a) zeigt, daß zwei unabhängige Porenpopulationen unterschiedlicher mittlerer Lebensdauer durch den Spannungssprung aktiviert wurden.

τ_R = 2,7 s und τ_S = 18,6 s

Montal-Mueller-Technik, Salzlösung: 1 M KCl, pH 6,o, Al-3o-Konzentration: o,2 µg cm^{-3}, Spannungssprung bei t = o von o auf +5o mV, Temperatur: 27°C.

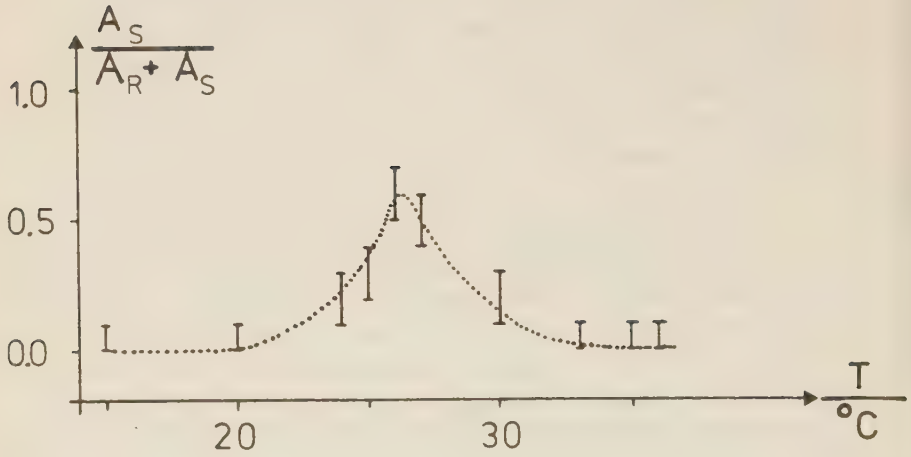


Bild 3.16

Darstellung des Verhältnisses der Stromamplitude A_s des langsamen Relaxationsprozesses dividiert durch die Summe der Amplituden A_s und A_R des langsamen bzw. schnellen Relaxationsprozesses als Funktion der Temperatur. Die Mittelwertbildung erfolgte über eine Vielzahl ausgewerteter Relaxationskurven, ohne daß Stromendwert oder Membranspannung in Betracht gezogen wurden. Bei T=27°C ist ein ausgeprägtes Maximum sichtbar.

Salzlösung: 1 M KCl, pH 6,o.

3.2 Fusion von proteinbeladenen Vesikeln mit planaren Bilayern im Bereich $T \leq T_c$

Das Schema in Kap. 1.3 wäre nach den dort aufgeführten Daten wie folgt zu vervollständigen:

	Fusion Vesikel-Vesikel	Fusion Vesikel- planarer Bilayer
1.	Mehrkomponentensystem mit negativ geladenen Lipiden > 1 mM Ca^{++} $T > T_c$, für jede einzelne Komponente	Mehrkomponentensystem mit negativ geladenen Lipiden > 1 mM Ca^{++} $T > T_c$, für jede einzelne Komponente osmotischer Gradient
2.	Einkomponentensystem $T \leq T_c$	Einkomponentensystem $T \leq T_c$ osmotischer Gradient

Somit sollte die Fusion von Vesikeln mit planaren Bilayern, die aus nur einer Komponente bestehen, bei $T \leq T_c$ und zusätzlicher Anwesenheit eines osmotischen Gradienten über der Membran möglich sein. Um den Nachweis einer solchen Fusion zu erbringen, wurden proteinbeladene Vesikel nach dem Bilden eines planaren Bilayers aus reinem 1,3-SMPC bei $T < T_c$ einseitig zur Kammerlösung gegeben. Bild 3.17 zeigt zwei Stromspuren, die in ihrem Erscheinungsbild vollständig Bild 1.3 entsprechen. Es wurden Membranfragmentvesikel aus Cilien von Paramecium tetraurelia verwendet, die folglich Kanal-bildende Proteine enthalten (ausführliche Beschreibung dieses Kanals in Kap. 3.2.3).

Folgende Bedingungen erwiesen sich für das Gelingen der Fusion als erforderlich:

1. hochgereinigtes Lipid (Einkomponentensystem)
2. $T \leq T_c$ (im Fall des 1,3-SMPC T_c = 29°C - 31°C)
3. a) osmotischer Gradient über dem planaren Bilayer: bei einseitiger Vesikelzugabe von der Zugabeseite zur Gegenseite; oder
   b) osmotischer Gradient über der Vesikelmembran: vom Vesikelinneren zur umgebenden Kammerlösung
4. die planaren Bilayer dürfen kein Cholesterin enthalten.

Bei Einhaltung dieser Bedingungen ergab sich folgendes qualitative Verhalten: Die Fusion hat ein Maximum im Bereich der Temperatur der Hauptphasenumwandlung. Oberhalb T_c nimmt die Fusionsrate zu höheren Temperaturen hin schnell ab, während unterhalb T_c die Abnahme der Fusionsrate langsamer erfolgt. Bei $T < 2o°C$ wurde praktisch keine Fusion mehr beobachtet. Die Abwesenheit oder Gegenwart von 1-4 mM Ca^{++} zeigt keinen Einfluß auf das Fusionsverhalten. Im Bereich der Phasenumwandlungstemperatur sind die Bilayer bei Fusionsexperimenten sehr instabil. Die Fusionsrate nimmt mit der Zeit nach Vesikelzugabe ab. Dies dürfte auf den Diffusionsausgleich des osmotischen Gradienten über der Vesikelmembran zurückzuführen sein. Die Fusionsrate nimmt aber auch mit der Zeit ab, wenn ein osmotischer Gradient über der Membran aufrechterhalten bleibt. Dies könnte seine Ursache in dem zunehmenden Einbau von Fremdsubstanzen in den planaren Bilayer haben.

Diese neue Methode der Vesikelfusion wurde nach ihrer qualitativen Charakterisierung zum Einbau und zur Untersuchung verschiedener biologischer Kanalproteine in planaren Bilayern verwendet. Kapitel 3.2.1 bis 3.2.3 beschäftigen sich mit dieser Fragestellung am Beispiel dreier Vesikelsysteme:

Bild 3.17

Text umseitig

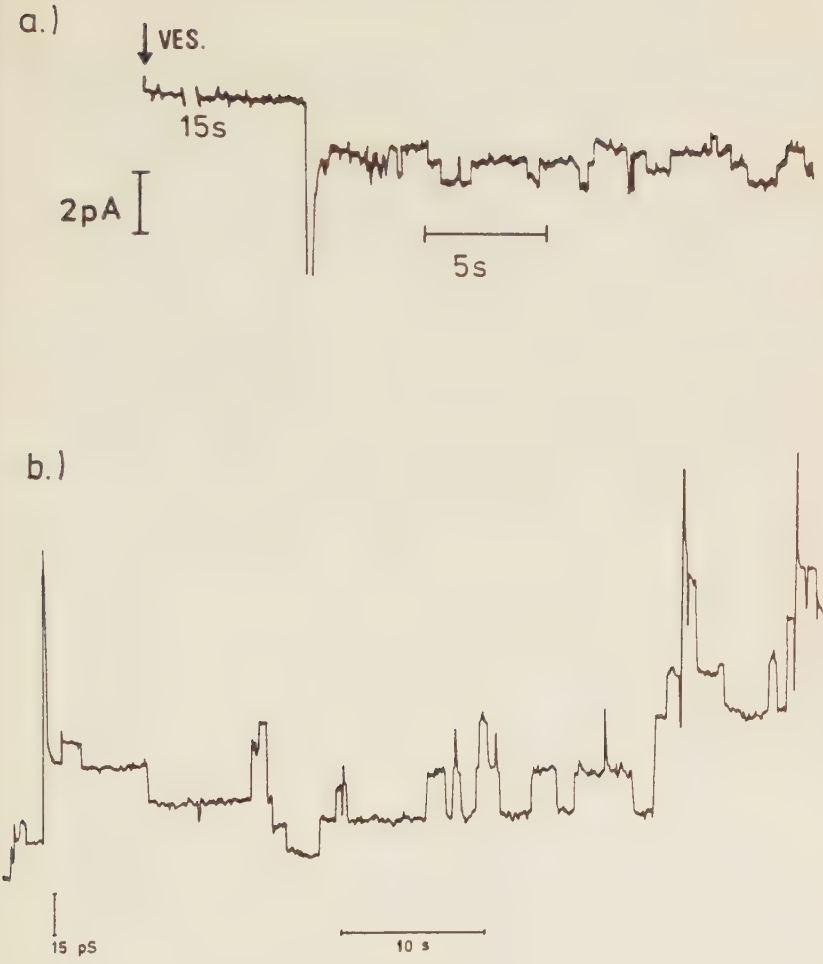


Bild 3.17

Fusion von proteinbeladenen Vesikeln mit einem planaren 1,3-SMPC Bilayer bei $T < T_c$. Es handelt sich um Membranfragmentvesikel aus Cilien von Paramecium tetraurelia, die in o,2 M Succrose, 1o mM MOPS, pH=7,2 vorinkubiert waren, Temperatur: 25°C.

Kammerlösungen: o,2 M KCl, 1 mM $CaCl_2$, 2 mM Na,K-Phosphatpuffer, pH 7,o vorne, o,1M KCl, sonst identisch, hinten.

a) Nach Vesikelzugabe (Pfeil) dauert es ca. 15 s bis ein Stromspike mit nachfolgenden sprunghaften Stromfluktuationen anzeigt, daß ein Fusionsereignis stattgefunden hat, U = -5o mV.

b) Eine Folge von drei Stromspitzen entspricht drei aufeinander folgenden Fusionsereignissen. Bei jedem dieser Ereignisse werden einige Kanalproteine im funktionellen Zustand in den planaren Bilayer eingebaut, erkennbar an der jeweiligen Zunahme der mittleren Leitfähigkeit, U = +1oo mV.

Elektroplaxmembranfragmente von Torpedo marmorata, affinitätschromatographisch gereinigter AChR in 1,3-SMPC Vesikeln und Cilienmembranfragmente von Paramecium tetraurelia.

3.2.1 Acetylcholinrezeptor-Membranfragmente

AChR-reiche Membranvesikel (s. Materialien und Methoden) wurden nach Vorinkubation mit der Badlösung + 1 M Saccharose nach der oben beschriebenen Methode mit planaren Bilayern aus 1,3-SMPC fusioniert. Die Vesikel wurden in der Regel nur einseitig zugegeben. In Bild 3.18 sind Erscheinungsformen von Fluktuationen aus "in vitro"-Messungen mit AChR-reichen Membranvesikeln aufgeführt. Bild 3.18 a) zeigt eine Folge schneller einzelner Kanäle, die charakterisiert sind durch einen einfachen Auf-Zu-Mechanismus im ms-Bereich, sogenannte s-Kanäle. Bild 3.18b) zeigt ein Beispiel für sogenannte 'Multiple-Gating'-Ereignisse, das sich auszeichnet durch eine Reihe mehrerer schneller Auf-Zu-Ereignisse direkt hintereinander, so daß angenommen werden muß, daß es sich um einen einzelnen Kanal handelt, der mehrfach hintereinander kurz öffnet und schließt.
Bild 3.18 c) ist ein Beispiel für ein 'Persistant-Opening'-Ereignis. Hierbei ist die Kanallebensdauer sehr groß und das Stromniveau des offenen Kanals ist durch kurze Sprünge zur Grundlinie unterbrochen ('Closing-Gaps'). Der Übergang von a) über b) nach c) entspricht einer Zeitentwicklung, die im Bildtext angegeben ist. Zur jeweils angegebenen Zeit wird dort der wahrscheinlichste Zustandstyp angezeigt.

Da durch Messungen mit der Patch-Clamp-Methode detaillierte Einzelkanalergebnisse an denervierten Frosch- und Rattenmuskeln vorliegen, s. Anhang, (67), liegt es nahe, die durchgeführten Messungen an Elektroplax-Präparationen mit diesen zu vergleichen. Es muß jedoch stets in Betracht gezogen werden, daß durch die verschiedenen Versuchsobjekte Unterschiede bedingt sein können.

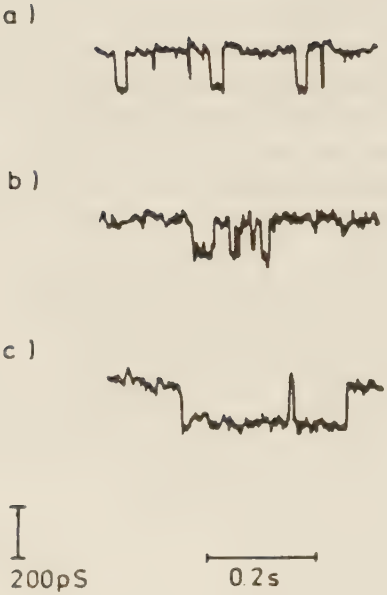


Bild 3.18

Kanalfluktuationen nach der Fusion von AChR-reichen Membranvesikeln und der Zugabe von ACh in planaren 1,3-SMPC Membranen. 5 µg Protein (entsp. 1o pmol α -Toxin-Bindungsstellen) pro ml Lösung wurden auf der Vorderseite zugegeben.

Kammerlösung: 1 M KCl, 4 mM Tris-Hepes, pH 7,4 auf beiden Seiten

ACh-Konzentration: 4oo nM auf der Vorderseite

Temperatur: 21 °C

Spannung: - 5o mV

a) 2 min nach Zugabe der Vesikel b) 6 min, c) 15 min

Aus Bild 3.19 ist ersichtlich, daß das Verhalten verschiedener Fluktuationstypen qualitativ mit dem in Bild 3.18 übereinstimmt, auch wenn bei den "in vivo"-Messungen keine vergleichbare Zeitentwicklung vorliegt. Die Leitwerte sind aufgrund der verschiedenen Salzlösungen unterschiedlich, die mittleren Lebensdauern sind in allen Fällen vergleichbar. Die Leitwerte sind von der jeweiligen Erscheinungsform des Kanals unabhängig. Die beschriebene Zeitabhängigkeit ist ausgeprägt bei Acetylcholin als Liganden. Bei Carbachol ist der Zeitbereich des Auftretens der verschiedenen Fluktuationstypen ausgedehnter. Bei Suberyldicholin treten von Anfang an häufiger 'Multiple-Gating'-Ereignisse auf.

Eine Abnahme der Kanalbildungsfrequenz um etwa eine Größenordnung wird innerhalb von ca. 15 min beobachtet. Die Kanalaktivität hängt vom physikalischen Zustand der Membran ab. Werden bei $T < T_c$ Vesikel mit der Membran fusioniert und durch Agonistenzugabe Kanalfluktuationen induziert, so verschwinden diese vollständig beim Aufheizen auf 38°C-4o°C, also auf $T > T_c$. Bis knapp unterhalb T_c sind aktive AChR-Kanäle beobachtbar, im Bereich $T \approx T_c$ ist jedoch eine Identifizierung wegen des Auftretens zusätzlicher spontaner Stromfluktuationen (siehe Bild 3.1) schwierig. Weiterhin ist festzustellen, daß bei einseitiger Vesikelzugabe Kanalfluktuationen auch durch Agonistenzugabe von der Gegenseite ausgelöst werden können.

In Bild 3.2o ist die Strom-Spannungskennlinie des offenen Einzelkanals in symmetrischen 1 M KCl- und 1 M NaCl-Lösungen dargestellt. Bild 3.2' zeigt eine Lebensdauerverteilung in linearer und halblogarithmischer Auftragung. Dabei wurden für die Strom-Spannungskennlinie alle Ereignisse, für die Lebensdauerauswertung aber nur die Zeitbereiche, bei denen bevorzugt schnelle Einzelereignisse auftraten, herangezogen. Für eine 1 M KCl-Lösung erhält man

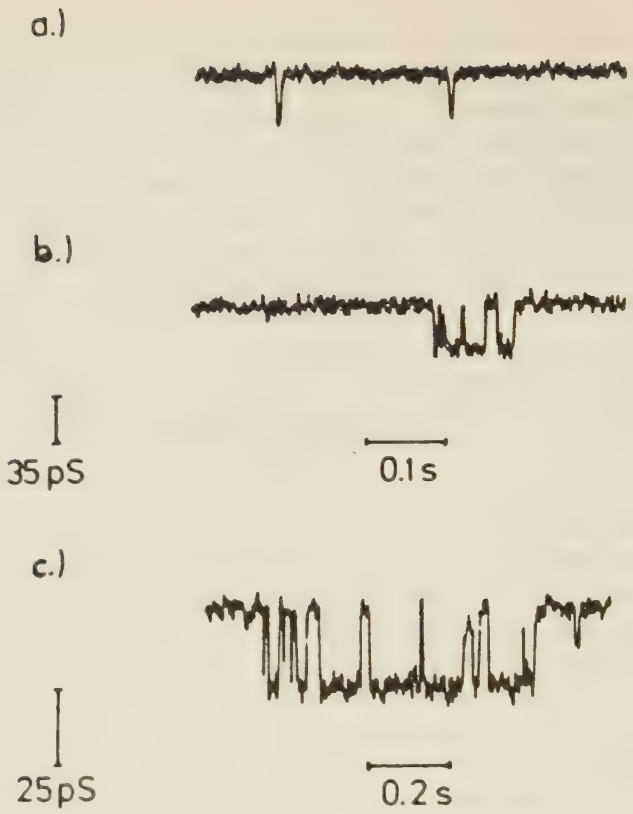


Bild 3.19

ACh-aktivierte Einzelkanäle, aufgenommen mit der Patch-Clamp-Technik an extrasynaptischen Zellmembranen von denervierten Ratten- (a,b) und Froschmuskeln (c).*
Agonistenkonzentration: o,5 µM ACh in der Patchpipette
a) Einzelkanäle mit τ =4,6 ms bei U= -12o mV und T= 21°C
b) 'Multiple-Gating'-Ereignis bei U = -12o mV u. T = 21°C,
c) Ereignis langer Dauer bei U= -15o mV und T= 11°C
Unter physiologischen und sym. Bedingungen (o,15 M NaCl) wurde Λ = 34 pS gefunden (für a) und b)) (71).
Es wird hier keine Zeitentwicklung beobachtet. Ereignisse wie c) sind sehr selten.

* Die Aufnahmen wurden freundlicherweise von Dr. B. Sakmann, MPI für biophys. Chemie, Göttingen, zur Verfügung gestellt. Ihm sei hierfür gedankt.

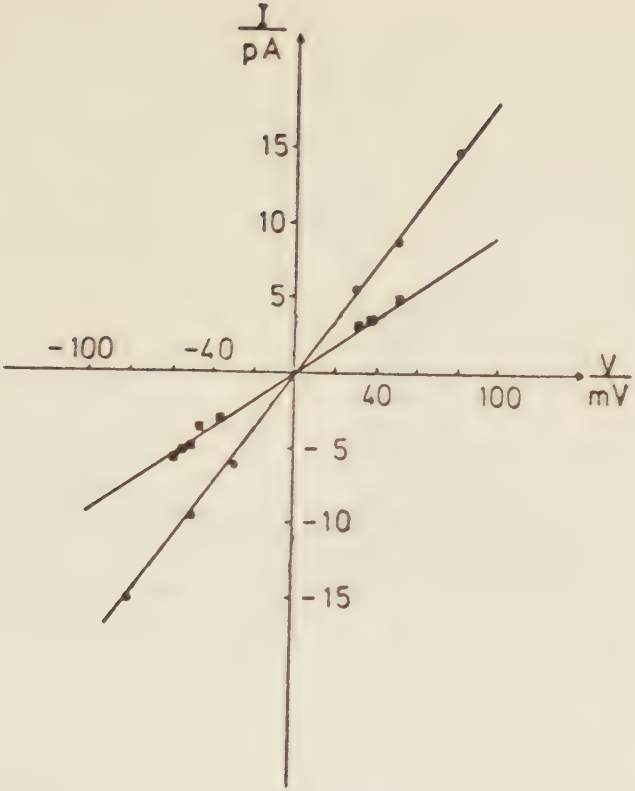


Bild 3.2o a

Strom-Spannungskennlinie des offenen ACh-aktivierten Kanals in 1 M KCl ● Λ = 185 pS
1 M NaCl ■ Λ = 95 pS

unter Versuchsbedingungen wie in Bild 3.1a.
Zur Charakterisierung der Schwankungsbreite der jeweiligen Leitwerte wird in Bild 3.2o b ein Amplitudenhistogramm für U =-5o mV gezeigt.

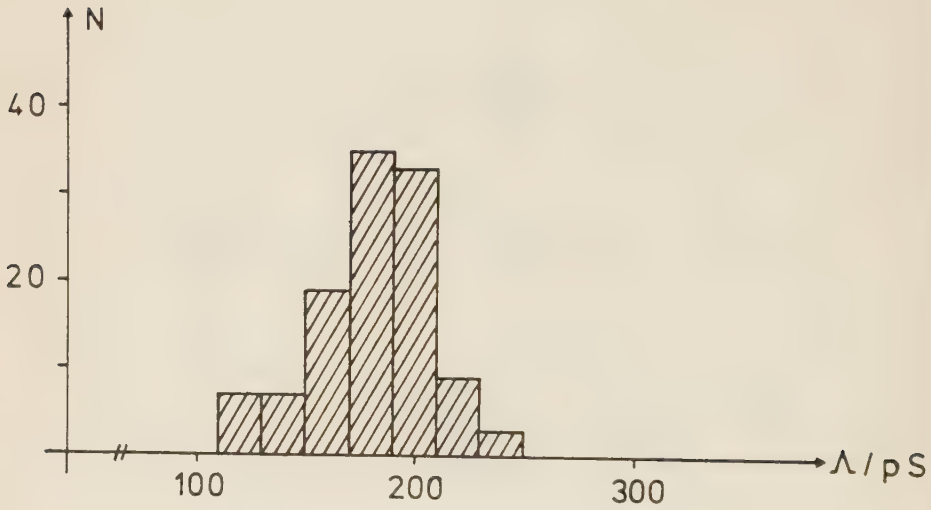


Bild 3.2o b

Amplitudenhistogramm der von ACh induzierten Kanalfluktuationen in 1 M KCl bei U = -5o mV. Die Verteilung läßt sich hinreichend gut durch eine Gauß-Verteilung annähern. Die Halbwertsbreite dieser Verteilung ist vergleichbar mit der von "in vivo"-Messungen (68) an Frosch-Muskelfasern.

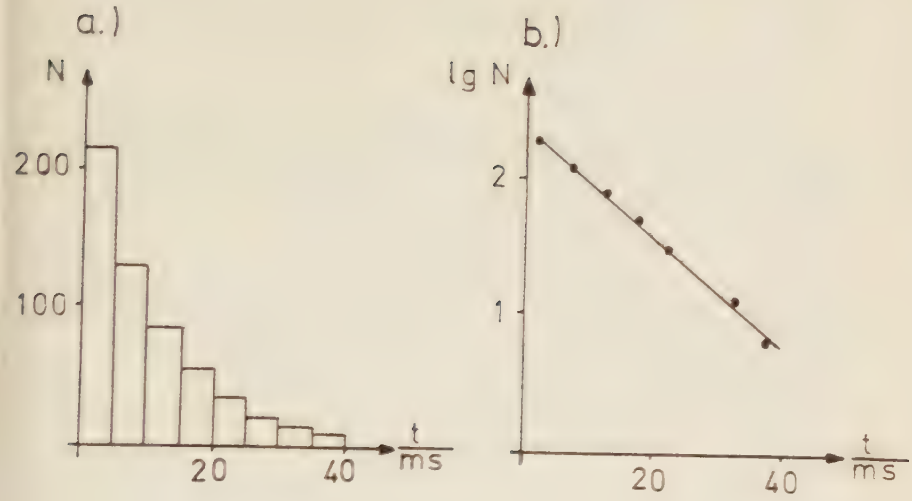


Bild 3.21

Lebensdauerverteilung einer Folge von ACh-aktivierten Einzelkanalereignissen (a).
Es wurden nur die schnellen Einzelkanäle ausgewertet. Man findet in der halblogarithmischen Darstellung (b) von N gegen die Lebensdauer t eine Geradenbeziehung über den gesamten Bereich, aus deren Steigung sich eine mittlere Lebensdauer von τ =8,4 ms ergibt. Die experimentellen Bedingungen entsprechen denen aus Bild 3.18.

unter den in der Legende zu Bild 3.18 angegebenen Bedingungen einen spannungsunabhängigen Leitwert des Kanals von Λ = 185 pS ± 1o%. Für die mittlere Lebensdauer erhält man aus der halblog. Auftragung für die schnellen Ereignisse τ = 8,8 ms ± 25%:

Es wurde die Abhängigkeit der Einzelkanaleigenschaften von der Art des Liganden untersucht. Das Ergebnis zeigt Bild 3.22. Die Lebensdauer ist Liganden-spezifisch, während der Kanalleitwert unbeeinflußt bleibt, die genauen Werte sind in Tabelle 3.4 aufgeführt.

In Tabelle 3.5 sind zur Dokumentation der Tatsache, daß bei Anwesenheit von einigen mM Ca^{++} auch die Leitwerte agonistenabhängig werden, die Selektivitäten, Leitwerte und mittlere Lebensdauern in Gegenwart von 1 M KCl und 1 M NaCl für ACh und Carb mit und ohne Calcium in der Badlösung angegeben. Für ACh als Liganden findet man ein Permeabilitätsverhältnis P_K / P_{Na} von ca. 2/1. Denselben Wert findet man auch bei Carb ohne Calcium. Bei Carb mit Calcium hingegen findet man für P_K/P_{Na} ungefähr o,9/1. Die Lebensdauern zeigen keine signifikante Abhängigkeit von der An- oder Abwesenheit von Calcium. Der Carb-abhängige Calciumeffekt auf den Kanalleitwert konnte nicht näher charakterisiert werden.

Es besteht die Möglichkeit, das Öffnen des AChR-Kanals durch das Besetzen des ACh-Bindungsplatzes durch ein α-Toxin vollständig zu unterbinden (1o4). Es wurden Vesikelpräparationen vor dem Versuch mit 5oo nM α-Bungarotoxin 3o min lang inkubiert und anschließend mit diesen Präparationen Fusionsexperimente mit planaren Bilayern durchgeführt. Dabei wurde ein vollständiges Fehlen der Agonisten-induzierbaren Aktivität festgestellt.

Weiterhin wurde die Wirkung des Lidocainderivats QX-222 (73) als Beispiel für ein Lokalanestheticum untersucht.

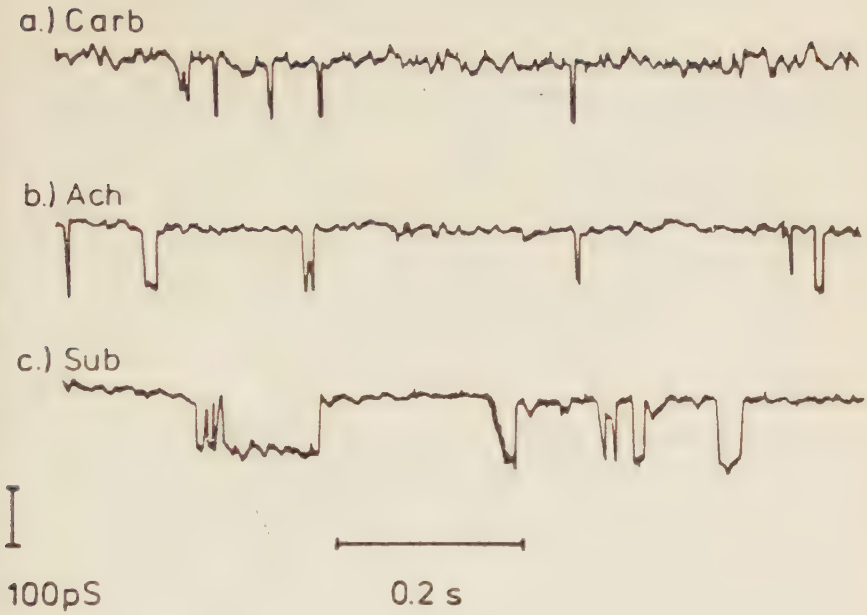


Bild 3.22

Agonistenabhängigkeit von AChR-Kanalfluktuationen.
Es wurden Membranfragmente auf der Vorderseite zugegeben und mit 1,3-SMPC Membranen fusioniert. Die Agonistenkonzentrationen waren:

Carb 1oo nM
ACh 1o nM auf der Vorderseite,
Sub 2 nM

alle anderen Versuchsparameter wurden konstant gehalten.
Kammerlösung: 1 M NaCl, 4 mM Tris-Cl, pH 7,2
Temperatur: 21°C
Spannung: - 1oo mV

Agonist	mittlere Lebensdauer τ /ms	Leitwert Λ /pS
1oo nM Carb	3,5	95
1o nM ACh	7,6	95
2 nM Sub	16	95

Tabelle 3.4

Agonistenabhängigkeit der Parameter Leitwert Λ und mittlere Lebensdauer τ des AChR-Kanals.

Versuchsbedingungen:

Kammerlösung: 1 M NaCl, 4 mM Tris Cl, pH 7,2
Temperatur: 21°C
Spannung: - 1oo mV

Carb (4o - 4oo nM)

	Salz	Λ /pS	τ /ms	E^{*}_{Alk} /mV ⊛	P_{Alk}/P_{Cl}
ohne Ca^{++},Mg^{++}	1M KCl	19o	2,8	22	5,1
	1M NaCl	95	2,7	17	3,3
mit Ca^{++},Mg^{++}	1M KCl	79	3,1	22	5,1
	1M NaCl	9o	3,8	23	5,7

ACh (1o - 4o nM)

	Salz	Λ /pS	τ /ms
ohne Ca^{++},Mg^{++}	1M KCl	185	9
	1M NaCl	95	7,6
mit Ca^{++},Mg^{++}	1M KCl	185	8,2

Tabelle 3.5
Einzelkanaldaten des AChR-Proteins in Abhängigkeit von Salzlösung und Agonist.

Versuchsbedingungen:

Kammerlösung: 1 M KCl oder 1M NaCl, 4 mM $CaCl_2$+2mM $MgCl_2$ oder nicht, 2-4 mM Na,K-Phosphatpuffer, pH 7,2-7,4
Temperatur: 21 - 24°C
Spannung: - 5o, - 1oo mV

⊛ Die Umkehrpotentiale E^{*}_{Alk} der Einzelkanäle wurden jeweils in einem 1M/ o,25 M Alkalichloridgradienten über der Membran bestimmt. Die Permeabilitätsverhältnisse P_{Alk}/P_{Cl} wurden mit diesen Werten nach der Goldmann-Gleichung berechnet.

Dazu wurden Membranfragmente mit einem planaren Bilayer fusioniert, dann Carb in dieselbe Kammer zugegeben und der Rezeptor aktiviert. Anschließend wurde nach weiteren 5 min 2o µM QX-222 zur Zugabeseite gegeben. Im Anschluß daran traten keine kurzen Einzelkanäle wie vor QX-222-Zugabe mehr auf, sondern lange Folgen von nicht auflösbaren Spikes. Dieses Verhalten ist in Bild 3.23 anhand eines Beispiels dargestellt. Unter a) ist das Verhalten vor Zugabe von QX-222 gezeigt. Es treten bevorzugt Einzelkanäle auf, die unter den in der Legende angegebenen Bedingungen durch τ = 3,1 ms und Λ = 79 pS charakterisiert sind. Bild 3.23 b zeigt das Verhalten nach Zugabe von QX-222. Die Spikes innerhalb einer Folge haben eine mittlere Lebensdauer τ<1 ms, während die mittlere Lebensdauer der Spikefolge selbst sehr viel größer als vorher ist. Die Wirkung eines kompetitiv bindenden Antagonisten (Hexamethonium) (75) wird in Bild 3.24 gezeigt. In die vordere Kammer wird zunächst eine hohe Konzentration Carb (4µM) gegeben (nicht auf dem Bild eingezeichnet), und dann nach ca. 2 min Membranfragmente. Es folgt ein steiler Leitfähigkeitsanstieg der Membran, entsprechend der Fusion von Vesikeln und dem Öffnen mehrerer Kanäle. Diese desensitisieren aufgrund der hohen Agonistenkonzentration im sec-Bereich. Danach werden 1o µM Hexamethonium (Endkonz. in der Kammer) und dann wieder dieselbe Menge an Membranfragmenten zugegeben. Dies führt nur zu einer geringen Leitfähigkeitsänderung.

Die Alkalibehandlung von AChR-reichen Membranfragmenten führt zu einer Trennung des peripheren 43.ooo Proteins vom AChR (91). Durch Fusionsexperimente derselben Art wie mit unbehandelten Membranfragmenten konnte gezeigt werden, daß dabei die Eigenschaften des Rezeptorproteins erhalten bleiben. Bild 3.25 zeigt qualitativ dieselben Effekte wie Bild 3.18, wobei allerdings 'Multiple-Gating'--Ereignisse von Anfang an häufiger auftraten.

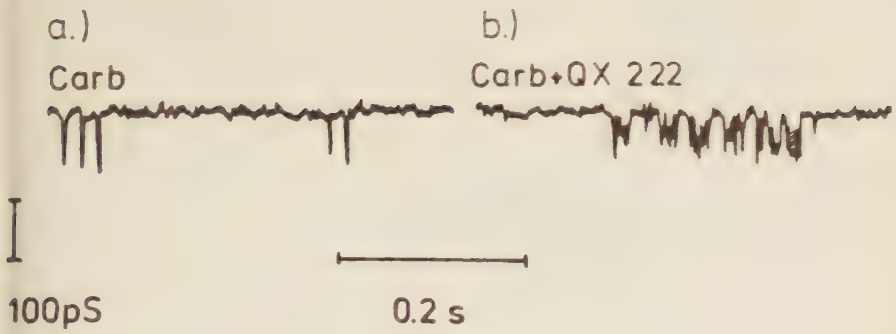


Bild 3.23

Effekt von QX-222 auf den AChR-Kanal. Es wurden AChR-reiche Membranfragmente mit 1,3-SMPC Membranen fusioniert.

Kammerlösung: 1M KCl, 4 mM $CaCl_2$, 2 mM $MgCl_2$, 2 mM K,Na-Phosphatpuffer, pH 7,3

Temperatur: 25°C

Spannung: -1oo mV

a) 1oo nM Carb auf der Vorderseite

b) 1oo nM Carb + 2o µM QX-222 auf der Vorderseite, QX-222 wurde 5 min nach Aufnahme von Spur a) zugegeben.

Deutlich zu sehen ist die Veränderung im Erscheinungsbild der Kanalfluktuation. Einzelereignisse werden zu einer Folge kurzer Spikes umgewandelt, wenn man annimmt, daß die gesamte Fluktuation unter b) einer Kanalöffnung entspricht.

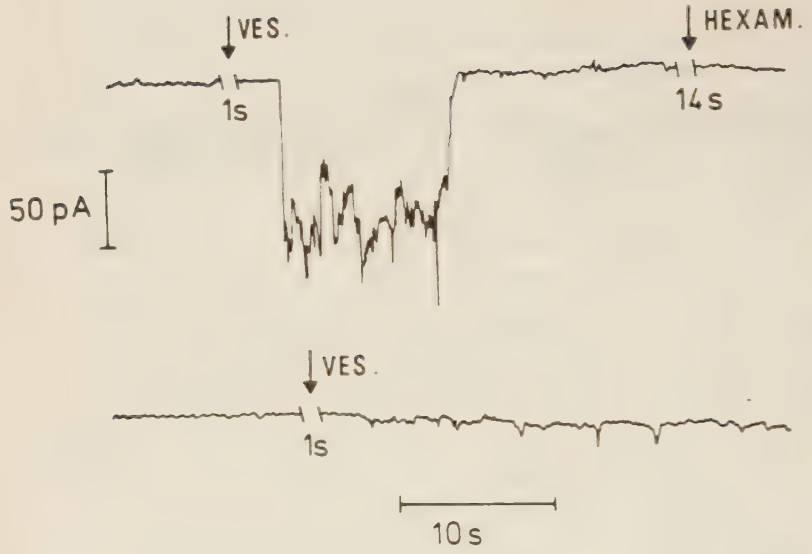


Bild 3.24

Effekt von Hexamethonium auf den AChR-Kanal. Es wurden 1,3-SMPC Membranen nach der Montal-Mueller-Technik gebildet
Kammerlösung: 1M KCl, 5mM Na,K-Phosphatpuffer, pH 7,o beidseitig, 4µM Carb auf der Vorderseite.
Temperatur: 25°C
Spannung: -5o mV.
Beim ersten Pfeil wurden Membranfragmente mit insgesamt 1o µ Protein (entsprechend 1o pmol α-Toxin-Bindungsstellen) zuge geben. Es folgt ein steiler Leitfähigkeitsanstieg der Mem- bran mit anschließender Inaktivierung der Ionenkanäle. Beim zweiten Pfeil wurde 1o µM Hexamethonium (Endkonz.) zugegeben und beim dritten Pfeil erneut Vesikel mit 1o µg Protein. Die Zugabe erfolgte immer auf der Vorderseite. Die zweite Vesikelzugabe bewirkt, verglichen mit der ersten, n einen geringen Effekt. Dies kann erklärt werden als kompe- titive Hemmung des Carb durch den Antagonisten.

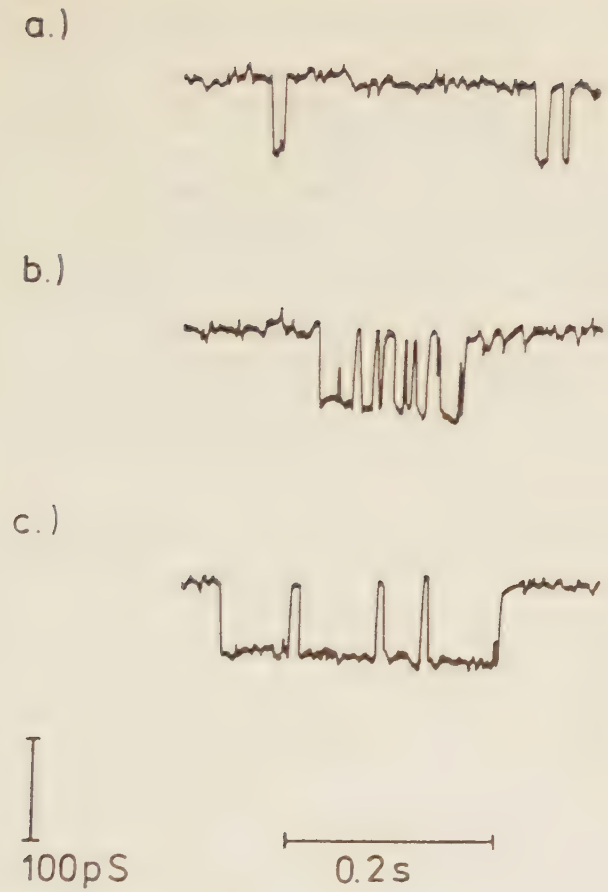


Bild 3.25

Analog zu Bild 3.28 durchgeführter Versuch mit Alkali-behandelten Membranfragmenten. 5µg Protein (entsprechend~1 pmol α-Toxin-Bindungsstellen) wurden auf der Vorderseite pro ml Lösung zugegeben.

Kammerlösung: 1M NaCl, 4mM Tris-Hepes, pH 7,4 auf beiden Seiten

ACh-Konzentration: 4o nM auf der Vorderseite

Temperatur: 21°C

Spannung: - 8o mV

3.2.2 Acetylcholinrezeptor - affinitätschromatographisch gereinigt

Bisher wurde gezeigt, daß es mit der hier entwickelten Methode möglich ist, AChR-reiche Membranfragmente in planare Bilayer zu rekonstituieren. Daß dabei die Funktion des ACh-akt.-Kanals voll erhalten bleibt läßt sich aus dem Vergleich mit den Patch-Clamp-Messungen (Bild 3.19) schließen. Um die Frage zu klären, ob der biochemisch charakterisierte AChR und der elektrophysiologisch analysierte ACh-akt.-Kanal auf demselben Protein lokalisiert sind und ob die Aktivität dieses Kanals lipidspezifisch ist, wurde in der Folge versucht, das hochgereinigte Rezeptorprotein (s. Kap. 2.4) in planare Bilayer nach der gleichen Methode einzubauen.

Technisch wurde wie unter 3.2.1 verfahren. Bild 3.26 zeigt wie Bild 3.18 typische Einzelkanalereignisse in ihrer Zeitabhängigkeit mit ACh als Ligand. Dabei kann festgestellt werden, daß das Verhalten des Rezeptorproteins in beiden Fällen gleich ist.

In Bild 3.27 werden eine Spur nach der Fusion von Membranfragmenten und eine Spur nach dem Einbau gereinigter AChR-Moleküle unter ansonsten identischen Bedingungen gegenübergestellt. Als Agonist wurde hier Carbachol verwendet. Die Übereinstimmung der Kanaleigenschaften ist gut. Das verminderte Rauschen beim aufgereinigten Rezeptor kann auch als Indiz für die höhere Reinheit der Präparation gewertet werden. Aus den Daten für Leitwert und mittlere Lebensdauer (Tabelle 3.6) kann man erkennen, daß sich der aufgereinigte Rezeptor wie der aus Membranfragmenten rekonstituierte verhält (siehe auch Tabelle 3.5).

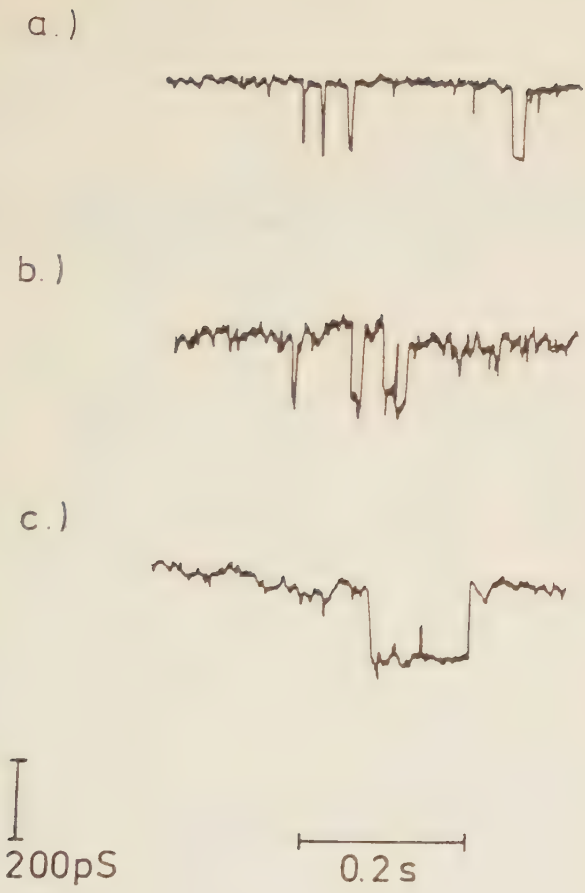


Bild 3.26

Einzelkanalereignisse nach der Fusion von 1,3-SMPC Vesikeln, in die gereinigte AChR-Moleküle eingebaut wurden, mit planaren 1,3-SMPC Membranen (Zweikomponentensystem). Die Versuchsbedingungen entsprechen denen von Bild 3.18. Es wurden 2,5 µg Protein (entsprechend~1o pmol α-Toxin-Bindungsstellen) pro ml Lösung zur vorderen Kammer zugegeben.

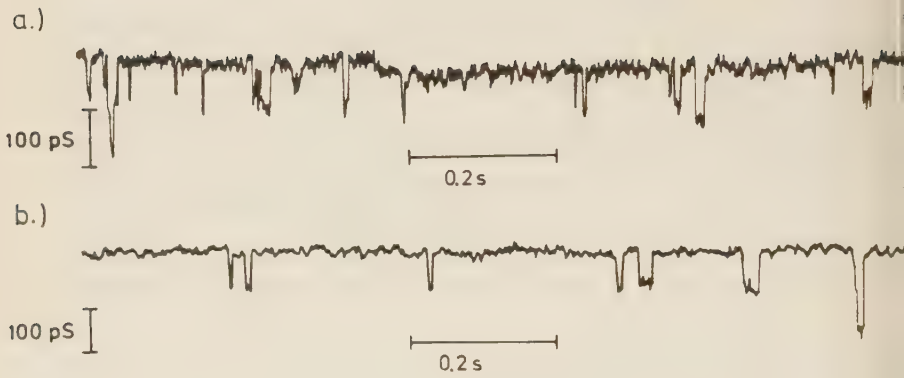


Bild 3.27

Vergleich von Carb-aktivierten Kanalfluktuationen in 1,3-SMPC Bilayern nach der Fusion von Membranfragmenten und von 1,3-SMPC Vesikeln mit gereinigtem AChR-Protein (

Kammerlösung: 1M KCl, 4 mM $CaCl_2$, 2 mM $MgCl_2$, 5 mM Na,K-Phosphatpuffer, pH 7,o

Temperatur: 25°C

Spannung: a) -5o mV, b) - 11o mV

Carb-Konzentration: o,4 µM

	ACh 1 M KCl 4o nM	Carb 1 M KCl + 4 mM $CaCl_2$ 1oo nM	Carb 1 M KCl 1oo nM
Λ	185 pS	82 pS	19o pS
τ	8,8 ms	4,2 ms	4,5 ms

Tabelle 3.6

Eigenschaften des gereinigten AChR-Proteins in planaren 1,3-SMPC Bilayern (Zweikomponentensystem)

Versuchsbedingungen:

Kammerlösung: wie angegeben + 4 mM Tris-HCl, pH 7,o

Temperatur: 24°C

Spannung: -8o → -1oo mV

3.2.3 Vesikel aus Cilienfragmenten

In einem weiteren Schritt zur Demonstration der Leistungsfähigkeit der neuen Rekonstitutionsmethode sollten Fragmentpräparationen eines biologischen Systems untersucht werden, bei dem prinzipiell keine Möglichkeit besteht, Vergleichsdaten von Einzelkanälen durch Patch-Clamp-Messungen zu erhalten. Es standen zwei verschiedene Präparationen von Membranfragmenten zur Verfügung. Dies waren Cilienmembranfragmente von Paramecium tetraurelia (Wildtyp) sowie die gleichen Fragmente einer Mutante, die als PawnA-Mutante Typ D4-94 bezeichnet wird und einen Ca^{++}-Transportdefekt in dieser Cilienmembran aufweist (siehe Kap. 1.5 und 6.4).

Die Vesikel wurden nach der oben beschriebenen Methode mit planaren 1,3-SMPC Bilayern bei $T < T_c$ fusioniert. Wie schon in Bild 3.17 gezeigt, findet man in o,1 M KCl-Lösung einen Kanal, dessen Eigenschaften in Tabelle 3.7 aufgeführt sind. Der Leitwert von Λ = 16 pS änderte sich nicht, wenn $CaCl_2$ nur einseitig zur Vesikelzugabeseite gegeben wurde und auf die Gegenseite EGTA. Dieser Sachverhalt ist in Bild 3.28 in Form einer Strom-Spannungskennlinie für alle untersuchten Fälle dargestellt. Die mittlere Lebensdauer der Kanäle zeigt für den asymmetrischen Fall eine leichte Spannungsabhängigkeit (Bild 3.29). Dabei ist die mittlere Lebensdauer bei negativerem Potential auf der Zugabeseite geringfügig kürzer. Die mittleren Lebensdauern wurden durch entsprechende halblogarithmische Auftragungen (Bild 3.3o) bestimmt. Aus der Tatsache, daß sich bei dieser Auftragungsart eine Gerade ergibt, folgt das Vorhandensein eines einfachen Auf-Zu-Kanals. Messungen in 1 M KCl-Lösung waren nicht möglich, da man nach Zugabe der Vesikelpräparation sehr unruhige Kanalniveaus erhielt. Dies könnte auf eine Instabilität der Kanalproteinstruktur bei hohen Salzkonzentrationen zurückzuführen sein. Aus den gleichen Gründen waren Messungen in o,1 M NaCl nicht möglich.

		0,1 M KCl	0,1 M KCl + 1 mM $CaCl_2$	0,05 M $CaCl_2$
Wildtyp	Λ	16 pS	16 pS	12 pS
	$\mathcal{T}$	0,5 s	0,8 s	0,5 s
Mutante	Λ	-	16 pS	–
	$\mathcal{T}$	-	25 ms	–

Tabelle 3.7

Einzelkanaldaten des kationischen Kanals aus Cilienmembranen

Versuchsbedingungen:

Kammerlösung: wie angegeben + 2 mM Na,K-Phosphatpuffer, pH 7,0

Vesikelinkubation: 200 mM Saccharose, 10 mM MOPS-Puffer, pH 7,2

Temperatur: 25°C

Spannung: -50 mV → -100 mV

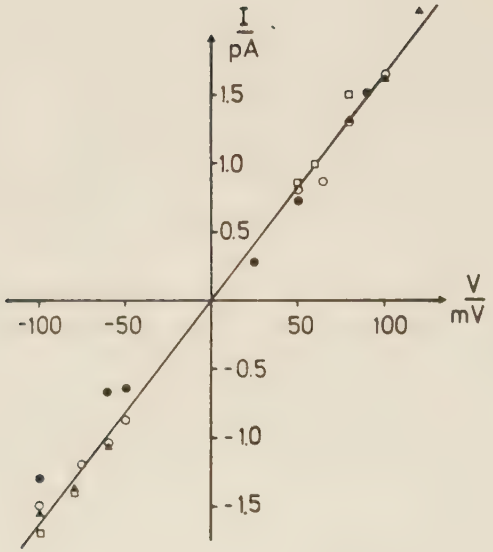


Bild 3.28 a

Strom-Spannungskennlinie der in Cilienmembranen gefundenen kationischen Kanäle unter verschiedenen Bedingungen in 1,3-SMPC Membranen.

Kammerlösung: o,1 M KCl, 2-4 mM K,Na-Phosphatpuffer, pH 7,2, 1 mM $MgCl_2$

Temperatur: 25°C

(○) Wildtyp, beidseitig +1 mM $CaCl_2$,

(●) Wildtyp, kein zusätzliches Ca^{++}

(▲) Wildtyp, Vesikelzugabeseite +1 mM $CaCl_2$, Gegenseite +1 mM EGTA,

(□) Pawn-Mutante, beidseitig +1 mM $CaCl_2$.

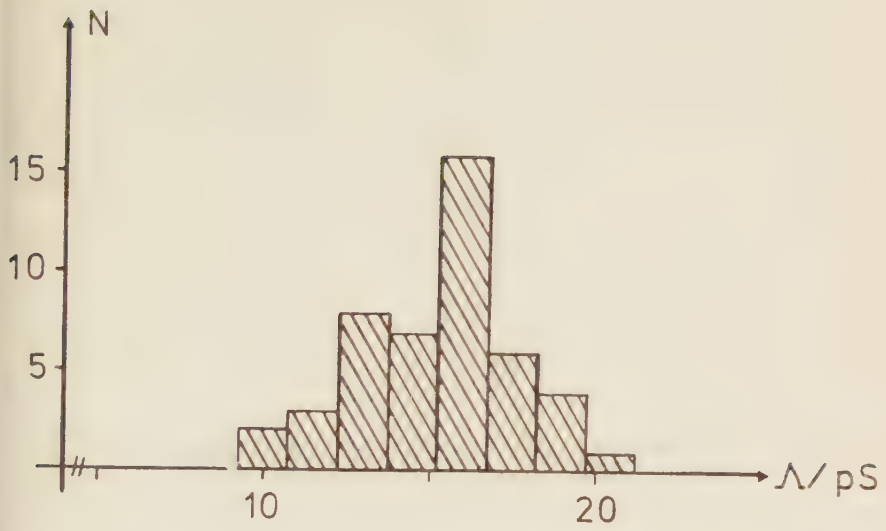


Bild 3.28 b

Amplitudenhistogramm (Leitwertverteilung) einer Folge von Einzelereignissen (Wildtyp) unter Bedingungen wie in Bild 3.28 a(O) ,bei einer Spannung von - 5o mV.
Das Amplitudenhistogramm läßt sich hinreichend gut durch eine Gaußverteilung annähern, die allerdings eine sehr große Halbwertsbreite hat.

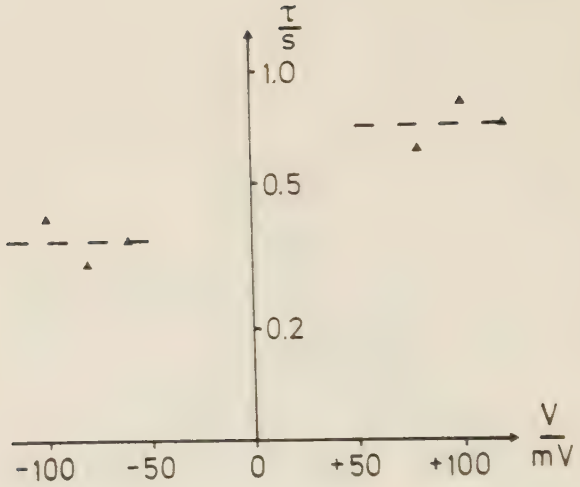


Bild 3.29

Spannungsabhängigkeit der mittleren Lebensdauer des kationischen Kanals aus Cilienmembranen unter asymmetrischen Ca^{++}-Bedingungen (Wildtyp).

Kammerlösung: 0,1 M KCl, 2 mM K,Na-Phosphatpuffer, pH 7,0

Vesikelzugabeseite: + 1 mM $CaCl_2$, Gegenseite: + 1 mM EGTA

Temperatur: 25°C

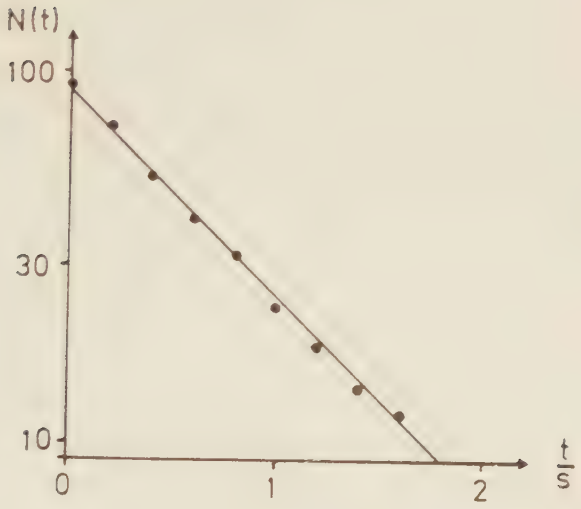


Bild 3.3o

Lebensdauerverteilung einzelner kationischer Kanäle nach der Rekonstitution von Cilienfragmenten (Wildtyp) in planaren Bilayern. Die experimentellen Bedingungen entsprechen denen aus Bild 3.28 b.
Die halblogarithmische Auftragung ergibt eine Gerade aus deren Steigung folgt:

$$\tau = 0{,}8 \text{ s}$$

Wegen der Frage nach der Ursache des Ca^{++}-Transports über die Cilienmembran (81,1o5) wurden Messungen in 5o mM $CaCl_2$ durchgeführt. Es ergaben sich die ebenfalls in Tabelle 3.7 aufgeführten Daten für den kationischen Kanal. Der langsame Kanal ist also auch permeabel für Ca^{++}. Das Verhältnis der Porenleitwerte stimmt nahezu mit dem entsprechenden Verhältnis der spez. Leitfähigkeiten für die KCl- und $CaCl_2$-Lösungen überein. Beispiele der Fluktuationsspuren sind in Bild 3.31 a)-c) gezeigt. Unter a) ist eine Fluktuation des kationischen Kanals aus Cilienfragmenten der PawnA-Mutante aufgeführt. Bei der Spur c) ist ebenso in 5o mM $CaCl_2$ die Stromfluktuation des langsamen kationischen Kanals aus der Cilienmembran des Wildtyps sichtbar. Bild 3.31 c) scheint die Existenz einer weiteren Klasse fluktuierender Kanäle aufzuzeigen. Diese Ereignisse sind sehr kurzlebig und meist nur als nicht aufgelöste Spikes zu erkennen. Anhand einiger Ereignisse längerer Lebensdauer läßt sich ein Leitwert von ca. 5o pS abschätzen. Für K^+ und Cl^- müssen diese Kanäle fast impermeabel sein, da dieser schnelle Fluktuationstyp bei den Messungen in o,1 M KCl fehlte. Da die Auflösung dieser Messungen bei einer Zeitauflösung von 1 ms etwa o,5 pA (s. Kap. 2.6.3) betrug und keine schnellen Kanäle aufgelöst wurden, muß ihr Leitwert in o,1 M KCl < 5 pS sein, gegenüber den oben genannten 5o pS in 5o mM $CaCl_2$. Eine genauere Charakterisierung dieses schnellen Ca^{++}-Kanals, besonders auch seiner Spannungsabhängigkeit und Kinetik bei niedrigen Ca^{++}-Konzentrationen, bleibt späteren Untersuchungen vorbehalten.

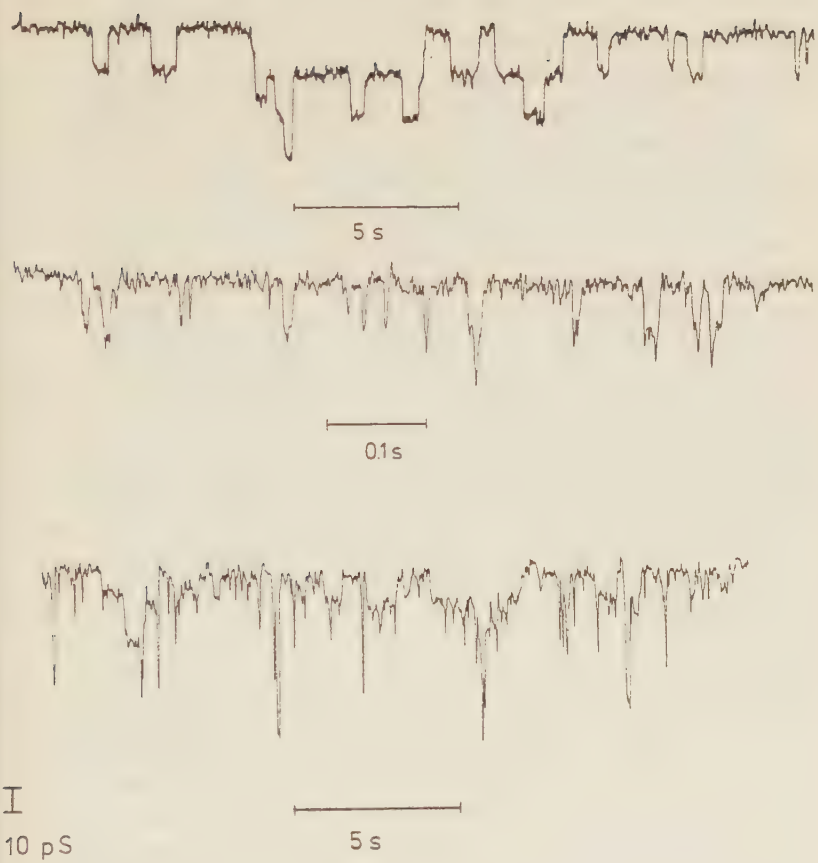


Bild 3.31

Einzelkanalfluktuationen von kanalbildenden Proteinen aus Cilienmembranen von Paramecium tetraurelia.

a) kationischer Kanal des Wildtyps in o,1 M KCl + 1 mM $CaCl_2$, -5o mV
b) kationischer Kanal der Pawn-Mutante in o,1 M KCl + 1mM $CaCl_2$, -1oo mV
c) kationischer Kanal des Wildtyps in o,o5 M $CaCl_2$, -5o mV. Zusätzlich sind schnelle Fluktuationen zu sehen, die einen spezifischen Ca^{++}-Kanal anzuzeigen scheinen.

Temperatur: 25°C

4. Diskussion

4.1 Reine Lipidmembranen

Die experimentellen Ergebnisse zeigen, daß es möglich ist, stabile planare Bilayer im Bereich der Temperatur der Phasenumwandlung des reinen Lipids und bis ca. 2o°C darunter herzustellen."Quasi"lösungsmittelfreie planare Bilayer aus gemischtkettigen Lecithinen zeigen in diesem Bereich eine vergleichbare Stabilität wie fluide Bilayer. Auch aus 1,2-DPPC lassen sich bei $T \leqslant T_c$ planare Bilayer herstellen. Messungen mit diesem Lipid führen zwar zu vergleichbaren Ergebnissen, jedoch ist ihre Stabilität wesentlich geringer. Eine Erklärung für diesen Effekt könnte die Tatsache darstellen, daß bei den verwendeten gemischtkettigen Lipiden eine Differenz von $4CH_2$-Gruppen in der Länge der beiden Kohlenwasserstoffketten in Bezug auf die Membranebene (1o6) vorliegt. Dies könnte zu einer Verzahnung von Ketten gegenüberliegender Lipidmoleküle führen und so den Bilayer stabilisieren.

Die Darstellung der Funktionen I = f(T) und C = f(T) in Bild 3.1, gleichzeitig gemessen an demselben Bilayer, zeigt Phasenübergangseffekte im Bereich der kalorimetrisch bestimmten Phasenumwandlungstemperatur T_c. Die Kapazität des Bilayers nimmt in diesem Bereich von $T > T_c$ nach $T < T_c$ um 1o - 2o% ab. Die großen Abweichungen und Ungenauigkeiten in den entsprechenden Messungen an 1,2-DPPC Bilayern bei $T < T_c$ können ihre Ursache in der evtl. hier nicht erfüllten Annahme einer konstanten Fläche haben. Geht man von einer konstanten Membranfläche aus, so ergibt sich nach:

$$C = \varepsilon_o \cdot \varepsilon \cdot \frac{F}{d}$$

F=Bilayerfläche, d=Dicke des hydrophoben Bereichs des Bilayers, ε_o=Influenzkonstante, ε=Dielektrizitätskonstante mit ε=2,1 für Bild 3.1 eine Änderung der Dicke von 2,25 nm oberhalb T_c nach 2,5 nm unterhalb T_c. Dieser Effekt ist erklärbar durch das Erstarren der Kohlenwasserstoffketten

des Lipids. Die CH_2-Gruppen nehmen hierbei die all-trans Konfiguration an. Dies verursacht ein Strecken der Ketten und führt zu einer Verdickung der Membran, wobei gleichzeitig ein Lipidmolekül einen geringeren Flächenbedarf aufweist. Der Strom über den Bilayer ist bei konstanter Spannung oberhalb und unterhalb T_c konstant. Im Bereich um T_c treten spontane Stromfluktuationen größerer Amplitude auf. Diese Fluktuationen können am einfachsten durch das Auftreten und Verschwinden einiger größerer Lecks in der Membran im Bereich $T \approx T_c$ erklärt werden. Experimente mit 1,2-DPPC Vesikeln zeigen im Bereich um T_c ein Maximum der $^{22}Na^+$--Selbstdiffusion über die Membran (1o7). Für diesen Effekt, den man mit den oben beschriebenen Stromfluktuationen korrelieren kann, gibt es mehrere Erklärungen. Einmal liegt im Bereich der Phasenumwandlung ein Zweiphasensystem vor: eine flüssig-kristalline Phase und eine gelartige (kristalline) Phase. Die unterschiedliche Packungsdichte an den Phasengrenzen kann zu Strukturinstabilitäten und somit zu einer erhöhten Permeabilität für Ionen führen (1o8). Andererseits führt das Erstarren der Kohlenwasserstoffketten zu einer Verringerung der benötigten Fläche pro Molekül. Dies geht mit einer Abnahme der lateralen Kompressibilität einher (1o9) und kann zu Störungen an den Phasengrenzen führen. Denkbar ist auch, daß Störungen durch nicht hinreichend schnelle Nachdiffusion des Lipids vom Teflonseptum her auftreten. Diese ist erforderlich, um die höhere Packungsdichte im kristallinen Bilayer zu ermöglichen.

Die experimentellen Ergebnisse deuten hier eher auf einige größere Lecks als auf Mikroinstabilitäten hin. Antonov et al. (11o) berichten über stufenförmige Stromfluktuationen in 1,2-DSPC-Bilayern, die nach der Mueller-Rudin-Technik (8) im Bereich der Phasenumwand-

lungstemperatur (59°C) hergestellt wurden. Dieses Resultat deckt sich qualitativ mit den vorliegenden Messungen. Jedoch kann aufgrund der hier präsentierten Daten noch nicht zweifelsfrei auf das Auftreten diskreter Kanäle in reinen Lipidmembranen bei $T \approx T_c$ geschlossen werden.

Eine interessante Fragestellung wirft der Vergleich von Monolayer- und Bilayermessungen unterhalb T_c auf. Wie ist der im Bilayer nicht meßbare und nicht kontrollierbare interne Druck π^B mit dem Spreitungsdruck π^M eines Monolayers korreliert? Bild 2.3 a-c zeigt Druck-Flächendiagramme von Monoschichten der verwendeten Lipide. Bei der angegebenen Temperatur $T < T_c$ sind in allen Fällen Phasenübergänge flüssig--kristallin → kristallin bei einem Umwandlungsdruck π_c^M sichtbar. Da wir wissen, daß der Bilayer bei derselben Temperatur im kristallinen Zustand vorliegt, sollte bei gleichem Druck $\pi^B = \pi^M \geq \pi_c^M$ folgen. Diese Beziehung sollte insbesondere für den von Schindler (111) definierten Gleichgewichtsdruck π_{eg}^M ($\triangleright \pi_c^M$) über einer Vesikellösung zwischen Monolayer und Bilayer gelten. Da bei Phasengrenzen jedoch Grenzlinienspannungen auftreten können und darüber hinaus die Natur des Grenzbereichs Monolayer-Bilayer nicht bekannt ist, ist eine Übertragung bzw. Gleichsetzung solcher Drucke nicht ohne weiteres zulässig.

4.2 Transportsysteme

Es konnte erstmals die Temperaturabhängigkeit der Eigenschaften verschiedener Ionentransportsysteme in planaren Bilayern in einem Bereich von 2o°C oberhalb und unterhalb T_c gemessen werden. Diese Messungen waren möglich sowohl mit gemischtkettigen Lipiden (1,3-SMPC und 1,2-HTPC) als auch mit 1,2-DPPC.

4.2.1 Carrier

Die Carrier-induzierte Leitfähigkeit eines 1,2-HTPC Bilayers zeigt bei einer Temperatur etwa 2°C unterhalb T_c einen abrupten Abbruch auf den Wert des undotierten Bilayers (Bild 3.2).
Hsu und Chan (112) zeigten, daß 2 mol % Valinomycin den Phasenumwandlungsbereich von 1,2-DPPC Vesikeln geringfügig verbreitern und zu 1°C niedrigeren Temperaturen hin verschieben. Aus diesen Messungen wurde geschlußfolgert, daß der Carrier überwiegend in der Nähe der polaren Kopfgruppen des Lipids lokalisiert ist und sich nur kurzzeitig während der Translokation des Carrier-Ion-Komplexes über die Membran in ihrem hydrophoben Inneren aufhält.
Der Abbruch der Leitfähigkeit bei 26°C - 27°C in Bild 3.2 dürfte durch das Ausfrieren des Carriers in die Grenzfläche Wasser-Lipid zu erklären sein. Diese These wird gestützt durch die nur geringfügige Absenkung der Phasenumwandlungstemperatur. Verbliebe eine größere Menge Carrier im hydrophoben Kern des Bilayers, so müßte dies zu einer drastischeren Erniedrigung der Phasenübergangstemperatur führen. Die Einlagerung des kugelförmigen Carriermoleküls mit einem Durchmesser von $\sim 4{,}5$ Å sollte zu einer ausgeprägten Störung der im Gelzustand ausgerichteten Kohlenwasserstoffketten führen.

Kombinierte Fluoreszens- und Leitfähigkeitsmessungen (113) führten zu der Aussage, daß durch eine Konzentration von $0{,}3 - 2 \cdot 10^{12}$ Carriermolekülen pro cm^2 eine Leitfähigkeit von $\lambda = 20\ \mu S\ cm^{-2}$ induziert wird. Da etwa $2 \cdot 10^{14}$ Lipidmoleküle pro cm^2 Membranfläche vorhanden sind, folgt für unseren Fall ein Verhältnis Carrier/Lipid von ca. $1/1 - 6 \cdot 10^2$. Dies ist nahezu die gleiche Größenordnung wie die oben genannten 2 mol %

Valinomycin, so daß die vorliegenden Messungen mit den Ergebnissen von Hsu und Chan (112) verglichen werden können.

Auch die Messungen von Krasne et al. (22) zeigen einen Abbruch der Carrier-induzierten Leitfähigkeit knapp unterhalb der Phasenumwandlungstemperatur des verwendeten Lipids.

4.2.2 Porenbildende Antibiotika

In Kapitel 3.1.3 wurde die Temperaturabhängigkeit der Porenbildung der Polypeptid-Antibiotika Gramicidin und Alamethicin beschrieben. Obwohl der Porenbildungsmechanismus völlig verschieden ist (41,5o), zeigen beide Polypeptide im Bereich der Phasenumwandlungstemperatur des reinen Lipids ein in vielen Punkten ähnliches Verhalten. Es liegt daher nahe, die zugrundeliegenden Mechanismen geschlossen zu diskutieren.

Im Gegensatz zu einem Carrier-System zeigen Poren-Systeme keinen sprunghaften Abbruch der induzierten Membranleitfähigkeit bei der Phasenübergangstemperatur. Sowohl Gramicidin- als auch Alamethicin-dotierte Bilayer zeigen mit abnehmender Temperatur von $T > T_c$ bis ca. 25°C-24°C einen Anstieg der Membranleitfähigkeit. Dieser Leitfähigkeitsanstieg ist beim Alamethicin sehr viel steiler und zudem spannungsabhängig. Krasne et al. (22) beobachteten bei Gramicidin-dotierten Bilayern keine signifikante Änderung im Bereich der Phasenumwandlungstemperatur. Ihre Daten lassen jedoch einen leichten Leitfähigkeitsanstieg in diesem Bereich erkennen. Unterhalb einer Temperatur von 23°C-24°C nimmt die Membranleitfähigkeit sowohl beim Gramicidin- als auch beim Alamethicinsystem wieder ab. In beiden Fällen verbleibt

bei $T < 14\text{-}16°C$ eine nahezu konstante Restleitfähigkeit, die größer als die der reinen Membran ist. In diesem Bereich wurden die Bilayer jedoch sehr instabil.

Chapman et al. (86) zeigten durch kalorimetrische Untersuchungen an 1,2-DPPC Vesikelsuspensionen den Effekt von Gramicidin A auf die Phasenumwandlung dieses Systems. Sie fanden eine Verbreiterung des Temperaturbereiches der Phasenumwandlung in Abhängigkeit von der eingesetzten Gramicidinkonzentration. Die DSC-Kurven ließen sich als Überlagerung einer breiten und einer schmalen Kurvenkomponente erklären. Kühlt man das System von $T > T_c$ ab, so bildet sich bei $T \approx T_c$ aus dem bis dort vorliegenden Einphasen - Zweikomponentensystem durch laterale Phasentrennung ein Zweiphasen-Zweikomponentensystem. Die eine Phase besteht aus fast reinem Lipid, wie der bei T_c verbleibende scharfe Peak in der DSC-Kurve anzeigt. Die andere Phase ist zweikomponentig (Lipid-Polypeptid). Sie wird durch den stark verbreiterten Peak in der DSC-Kurve angezeigt, wobei das Maximum der Wärmeabgabe ca. 5-7°C unterhalb T_c auftritt. Der beschriebene Effekt entspricht einer lateralen Entmischung in eine reine Lipidphase, die bei $T < T_c$ im kristallinen Zustand vorliegt und in eine Lipid-Polypeptidphase, die bis weit unterhalb T_c flüssig bleibt.

Die Leitfähigkeit eines Gramicidin-dotierten Bilayers hängt mit der zweiten Potenz von der Gramicidin-Konzentration in der Kammerlösung ab (114). Bei Alamethicin wurde in dieser Arbeit für das verwendete Lipid 1,3-SMPC eine Konzentrationsabhängigkeit etwa mit der 7. Potenz gezeigt (Bild 3.9). In der Literatur werden je nach Lipid und Temperatur Werte von $C_{Al}^{6} \rightarrow C_{Al}^{11}$ angegeben (48,52,56).

Die Gramicidin-induzierte Leitfähigkeit steigt von ihrem Wert bei 3o°C bis zum Maximum bei 23°C etwa um den Faktor 1,3 → 1,4 (Bild 3.3). Die Membranleitfähigkeit des Alamethicinsystems steigt in demselben Intervall auf etwa den 15fachen Wert. Im folgenden soll abgeschätzt werden, inwieweit die Erhöhung der Membranleitfähigkeit durch Gramicidin und Alamethicin bei $T \leq T_c$ durch denselben Effekt der lateralen Phasentrennung, d.h. durch das Entmischen in die flüssige Phase, erklärt werden kann. Bei dem Alamethicin-System muß noch der in Kap. 3.1.3.2.c beschriebene Effekt (Bild 3.16) des Auftretens zweier Porenpopulationen in Betracht gezogen werden. Dies führt zur Halbierung des oben genannten Wertes von 15 auf 7,5. Bei gleichartiger Entmischung sollten die Konzentrationsverhältnisse

$$\frac{C\ (23°C)}{C\ (3o°C)}$$

für Gramicidin und Alamethicin in der flüssigen Phase vergleichbar sein. Unter Berücksichtigung der entsprechenden Konzentrationsabhängigkeiten der induzierten Membranleitfähigkeiten λ sollte dann gelten:

$$\sqrt[2]{\frac{\lambda\,(23°C)}{\lambda\,(3o°C)}}_{\text{Gram}} \approx \sqrt[7]{\frac{\lambda\,(23°C)}{\lambda\,(3o°C)}}_{\text{Al}} .$$

Die Werte $\sqrt[2]{1,4} \approx 1,2$ und $\sqrt[7]{7,5} \approx 1,3$ erfüllen diese Beziehung im Rahmen der Meßgenauigkeit. Diese Rechnung setzt voraus, daß sich der mittlere Porenleitwert im Bereich von 3o°C nach 23°C nicht wesentlich ändert. Die Einzelkanalmessungen in Kap. 3.1.3 stützen diese Annahme. Das Vielkanalverhalten von Bilayern, die mit porenbildenden Peptiden dotiert sind, kann also zumindest qualitativ durch eine laterale Phasentrennung bei $T \leq T_c$ erklärt werden.

Die durch die Porenbildner induzierte Vielporenleitfähigkeit nimmt nach Durchlaufen des Maximums bei 23-24°C bei Konstanthalten aller anderen Parameter mit abnehmender Temperatur wieder ab. Diese Abnahme dürfte ihre Ursache in einem Einfrieren der verbleibenden flüssigen Phase haben. Schließlich erstarrt auch das die Peptidmoleküle umgebende, noch bewegliche 'boundary'-Lipid. Die "eingefrorenen" Peptidmoleküle in den kristallinen Bereichen sind fast vollständig in einem nicht aktiven Zustand immobilisiert und tragen daher nicht mehr zur Porenbildung bei, sodaß die Gesamtleitfähigkeit kleiner wird.

Weitere Aussagen über die vorliegenden Systeme kann man aus den Messungen der Einzelkanalparameter im Bereich um T_c gewinnen.

Sowohl beim Gramicidin als auch beim Alamethicin zeigt das Auskristallisieren der reinen Lipidphase bei $T \leq T_c$ keinen Effekt auf die Poren- bzw. Niveauleitwerte. Diese lassen sich über den gesamten gemessenen Temperaturbereich in der Darstellung $\lg \Lambda = f\ (^1/T)$ durch eine Gerade annähern. Die Werte für die Aktivierungsenergien von $E_A\ (\Lambda_{Gr}) = 16\ kJ\ mol^{-1}$, $E_A\ (\Lambda_{\gamma}\ Al) = 25\ kJ\ mol^{-1}$ sind nahezu gleich der Aktivierungsenergie für die spezifische Leitfähigkeit der wässrigen Salzlösungen. Das Einfrieren der Kohlenwasserstoffketten des Lipids scheint also nicht die Struktur der Poren zu beeinflussen. Dies bedeutet jedoch, daß die Lipide in der direkten Umgebung der Pore in einem beweglichen Zustand verbleiben.
In der mittleren Lebensdauer der Gramicidinporen tritt ein signifikanter Effekt bei $\sim 26°C$, also knapp unterhalb T_c auf. Oberhalb 26°C findet man eine Aktivierungsenergie für den zugrunde liegenden Prozeß von etwa $78\ kJ\ mol^{-1}$. Dieser Wert stimmt mit den von Bamberg und

Läuger (45) gemessenen Werten in Membranen bei $T > T_c$ gut überein. Unterhalb 26°C beträgt die Aktivierungsenergie jedoch nur noch ca. 29 kJ mol^{-1}. Die Bildung der Gramicidinporen findet über eine Dimerisierung zweier Monomere statt. Hierbei werden drei Wasserstoffbrücken ausgebildet (43). Der oben beschriebene Effekt der Erniedrigung der Aktivierungsenergie, der in einer geringeren Zunahme der mittleren Lebensdauer besteht als man bei konstant gebliebener Aktivierungsenergie erwartet hätte, könnte auf einen Einfluß der Lipidphasenumwandlung auf den Bindungswinkel und somit auf die Bindungsenergie der Wasserstoffbrückenbindungen zurückzuführen sein. Dies würde das Einwirken von Scherkräften auf die Bindungsstelle des Dimers zwischen den beiden gefrorenen Monoschichten eines Bilayers bedeuten.

Ein vergleichbarer Effekt wird bei den mittleren Lebensdauern der Alamethicinpore und den Porenniveaus nicht beobachtet. τ_P und τ_γ lassen sich in der Darstellung $\lg (1/\tau) = f (1/T)$ bis ca. 21°C - 22°C durch eine Gerade annähern. Die sich hieraus ergebenden Aktivierungsenergien von $E_A (1/\tau_P) = 182$ kJ mol^{-1}, $E_A (1/\tau_\gamma) =$ 71 kJ mol^{-1} stimmen mit den Literaturwerten für Bilayer im flüssigen Zustand hinreichend gut überein (52,56). Diese Daten sind mit der Annahme konsistent, daß die Alamethicinpore aus membranüberspannenden Molekülen besteht (5o). Scherkräfte zwischen den Monolayern, wie oben geschildert, sollten daher keinen Einfluß auf den Porenzerfallsprozeß haben. Die zunehmende Unbeweglichkeit der Lipide in der direkten Porenumgebung hingegen dürfte die Ursache für die höheren Aktivierungsenergien $E_A(1/\tau_\gamma) = 157$ kJ mol^{-1} und $E_A(1/\tau_P) = 315$ kJ mol^{-1} bei $T < 21°C-23°C$ sein.

Das Verhalten der Porenfrequenz wird primär durch den Effekt der lateralen Phasentrennung beschrieben und ist

für Gramicidin und Alamethicin in Einklang mit den jeweiligen Porenmodellen. Dieser Effekt wurde bereits bei der Betrachtung der Antibiotika-induzierten Membranleitfähigkeiten diskutiert.

Einzelporenmessungen und Vielporenmessungen liefern für Gramicidin übereinstimmende Ergebnisse (Bild 3.5), wobei die induzierte Membranleitfähigkeit im wesentlichen durch die Temperaturabhängigkeit der Porenbildungsfrequenz bestimmt wird. Das Verschieben des Leitfähigkeitsmaximums hin zu niedrigeren Temperaturen bei steigender Gramicidinkonzentration im Bilayer stimmt mit der Erwartung einer höheren Gefrierpunktserniedrigung bei einem Zweikomponentensystem überein.

Auch beim Alamethicin kann man das Vielporenverhalten durch die Einzelporendaten erklären. Man muß jedoch berücksichtigen, daß im Bereich um T_c zusätzlich die zweite, langsame Porenpopulation auftritt, die trotz der geringen Zahl der Porenereignisse (ca. $^1/_{100}$ der Gesamtzahl) aufgrund der langen Porenlebensdauern bis zu 50% der Gesamtamplitude ausmacht (Bild 3.16). Man kann also nicht wie beim Gramicidin (Bild 3.5) $I(T) = f(T)$ des Vielporensystems und

$$\frac{\lambda(T)}{\lambda(20°C)} = f(T)$$ des Einzelporensystems miteinander vergleichen, vielmehr muß man eine Kombination der Daten für die kurzlebige Population (Bild 3.13c)

$$\frac{\lambda(T)}{\lambda(20°C)} = f(T)$$

und der Daten für die langlebige Population (Bild 3.16)

$$\frac{A_S(T)}{A_S(T) + A_R(T)} = f(T)$$ mit der Temperaturabhängigkeit der Vielporenleitfähigkeit (Bild 3.8) vergleichen. Die erste Abnahme der Leitfähigkeit des Vielporensystems nach dem ausgeprägten Maximum bei ca. 24°C dürfte auf

das Verschwinden der langlebigen Porenpopulation, die zweite Abnahme nach der Schulter bei 2o-22°C auf das Verschwinden der kurzlebigen Porenpopulation zurückzuführen sein. In beiden Fällen ist die Temperaturabhängigkeit der Porenbildungsfrequenz die bestimmende Variable.

Beobachtet man einzelne Poren bei Temperaturen weit unterhalb T_c ($T \approx 1o-16°C$), so stellt man bei beiden Porenbildnern fest, daß die Poren hier instabil werden und teilweise überproportional lange Lebensdauern zeigen. Dieser Effekt kann am einfachsten durch die Annahme erklärt werden, daß hier das die Pore umgebende Lipid gefriert und folglich auch diese Phase vollständig erstarrt.

Gestützt wird diese Vermutung durch die in Kap. 3.1.3.2c dargelegten Ergebnisse. Im Bereich um T_c treten zwei getrennte Porenpopulationen auf, die sich im wesentlichen in ihrer Lebensdauer unterscheiden. Dabei zeigt die schnelle Population eine "normale" Temperaturabhängigkeit, während die langsame Population Lebensdauern aufweist, die denen der Poren kurz vor dem vollständigen Einfrieren entsprechen. Einzelporen- und Vielporensysteme zeigen dabei die gleichen Effekte. Sie sind erklärbar durch das Auftreten der lateralen Phasentrennung bei $T \leqslant T_c$. In der flüssigen Phase zeigen die Alamethicinporen das "normale" Verhalten und in der gefrierenden Phase treten durch das Erstarren des die Poren umgebenden Lipids sehr lange Lebensdauern auf. Die Instabilität dieses Zustandes wird durch die ungewöhnlich häufigen Übergänge zwischen benachbarten Niveaus angezeigt. Die Amplitude der langsamen Komponente bei den Relaxationsmessungen (Bild 3.16) hat 2-3°C unterhalb T_c ein Maximum und macht hier etwa 5o% der Gesamtamplitude aus. Bei einem Lebensdauerverhältnis von 1:1oo (Tabelle 3.3) bedeutet das bei fast gleichen Porenleitwerten ein Porenfrequenzverhältnis von 1oo kurzlebigen Poren : 1 langlebiger Pore. Konzentrations-

angaben in den beiden Phasen sind aufgrund der unbekannten Flächenverhältnisse nicht möglich. Jedoch kann aus den Vielkanalmessungen in Kap. 3.1.3 geschlossen werden, daß der größte Teil des Alamethicin in die flüssige Phase entmischt. Bei weiterem Abkühlen frieren immer mehr Teile der flüssigen Phase ein. Die Peptidmoleküle in der gefrierenden Phase werden immobilisiert, so daß der Anteil der langsamen Komponente sowie die Gesamtrelaxationsamplitude abnehmen.

Das Vorhandensein von Alamethicin auch in der festen Phase könnte zwei verschiedene Ursachen haben. Einmal sind die Diffusionszeiten aus den festen Bereichen heraus so groß, daß man bei den verwendeten Systemen im Verlauf der Messung kein Gleichgewicht erreicht. Andererseits dürfte Alamethicin in geringen Mengen auch mit der kristallinen Phase des Lipids mischbar sein.

4.2.3 Rekonstituierte Kanalproteine

Das Erarbeiten einer neuen Methode zur Rekonstitution von kanalbildenden biologischen Proteinen in planare Bilayer war Voraussetzung für die Untersuchung des ACh-akt.-Kanals und der Cilienkanäle in planaren Bilayern wie in Kap. 3.2.1 bis 3.2.3 beschrieben.

Bei den Bilayermessungen am AChR wurde der Agonist meist in die vordere Küvettenhälfte gegeben. Bei den Patch-Clamp-Messungen wird der Agonist zur Zellaußenseite gegeben. In beiden Fällen werden nur Rezeptoren aktiviert, deren Agonistenbindungsstellen zur Zugabeseite orientiert sind. Somit entspricht die Zugabeseite im Bilayer-Experiment der Zellaußenseite im Patch-Clamp-Experiment. Dies führte zur in Kap. 2.7 gegebenen Vorzeichenwahl, da im Patch-Clamp-Experiment die Zellaußenseite meist auf Erdpotential liegt. Es wurden "in vitro"-Messungen am AChR aus elektrischen Organen von Torpedo marmorata in 1,3-SMPC Membranen mit "in vivo"-Messungen an denervierten Frosch- und Ratten-

muskeln verglichen. Das qualitativ gleiche Verhalten deutet darauf hin, daß der ACh-aktivierte Kanal und das ACh-bindende Rezeptorprotein dasselbe Molekül sind. Mittlere Lebensdauer und Leitwert der schnellen Einzelkanäle in AChR-enthaltenden 1,3-SMPC Membranen liegen in der gleichen Größenordnung wie die der ACh-aktivierten Kanäle in Rattenmuskeln, wenn man die verschiedenen Lösungen (1 M NaCl beim Bilayer gegen ca. o,15 M NaCl am Muskel) berücksichtigt. Direkte Vergleichsmessungen bezüglich des Leitwertes und der Lebensdauer liegen für das Alamethicin vor.

	Bilayer (1,3-SMPC) 1 M NaCl sym.		Rattenmuskelmembran o,15 M NaCl (61,71)	
	Λ	τ	Λ	τ
Al γ = 2	14o pS	5 ms	27 pS	35 ms
ACh-akt. -Kanal	95 pS	8 ms	34 pS	5 ms

Das Leitwertverhalten in Bilayer und Rattenmuskelmembran ist für Alamethicin und den ACh-akt.-Kanal vergleichbar, das Lebensdauerverhalten nicht. Wahrscheinlich erklärt die unterschiedliche Lipidzusammensetzung in den verglichenen Systemen die Differenzen in den vorliegenden Daten. Beim Bilayer wurde ein reines synthetisches Lipid verwendet, in der Muskelmembran liegt ein Gemisch aus negativ geladenen Lipiden, Cholesterin und anderen Lipiden vor, das sich zudem noch in einem unbekannten physikalischen Zustand befindet. Die fehlende Spannungsabhängigkeit der "in vitro"-Kanäle scheint eine Eigenschaft des Torpedorezeptors zu sein (115). Ein wesentlicher Punkt in der Beurteilung der normalen Funktionsfähigkeit des AChR ist seine pharmakologische Charakterisierung. Im

"in vitro"-System wurden vergleichbare Agonistenabhängigkeiten der Kanalparameter gefunden wie im "in vivo"-System (67). Die Blockierbarkeit des Rezeptors durch α-Bungarotoxin wurde beobachtet, ebenso die Blockierungseffekte durch den Antagonisten Hexamethonium und das Lokalanestheticum QX-222 (73). Für die zeitabhängige Änderung der Natur der Acetylcholin-induzierten Fluktuationen liegt keine schlüssige Erklärung vor. Das Fehlen des in der natürlichen Membran vorhandenen Cholesterins (Schindler (116)) sowie der Kontakt mit dem (unnatürlichen) Lipid könnten hier jedoch eine Rolle spielen. Das Rezeptorprotein benötigt eine relativ starre Lipidmatrix in der weiteren Umgebung, da oberhalb T_c keine Kanäle mehr beobachtet werden. Dieses Resultat stimmt mit Ergebnissen von Schindler und Quast (116) überein, die erst kürzlich Ergebnisse aus "in vitro"-Messungen am AChR veröffentlichten. Sie rekonstituierten das AChR-Protein über Monoschichtbildung aus Vesikelsuspensionen in Bilayer. Sie verwendeten dabei Lipide, deren Kohlenwasserstoffketten stets in flüssigem Zustand waren. Es war jedoch ein Mindestprozentsatz von Cholesterin in den Bilayern erforderlich, um aktive Kanäle zu beobachten. Die Zugabe von Cholesterin zu Lipidbilayern bei $T \gtrsim T_c$ führt z.B. beim Alamethicin zu einer Verlängerung der Porenlebensdauern (117). Dies ist auf ein Versteifen der Kohlenwasserstoffketten der Lipide durch das Cholesterin zurückzuführen. Weiterhin konnte im Gegensatz zu Schindler und Quast (116) gezeigt werden, daß der Rezeptor in den Bilayern nicht ausschließlich gerichtet eingebaut ist. Nach der Zugabe von Vesikeln auf nur einer Membranseite konnten Kanalfluktuationen ausgelöst werden, indem ein Agonist entweder auf dieselbe oder die gegenüberliegenden Seite gegeben wurde. Es muß angenommen werden, daß das Verfahren von Schindler zur Denaturie-

rung einiger AChR - Proteine führt, da ein Teil des Proteinmoleküls in der Lipidmonoschicht der Luft ausgesetzt wird. Der agonistenabhängige Ca^{++}-Effekt auf den Leitwert des AChR-Kanals kann nicht erklärt werden. Der in 1 M KCl + 4 mM $CaCl_2$ mit Carb als Agonisten gemessene Leitwert stimmt mit den von Schindler und Quast (116) veröffentlichten Werten überein.

Der nachfolgende notwendige Schritt zu einer eindeutigen Identifizierung des biochemisch charakterisierten AChR mit dem elektrophysiologisch untersuchten ACh-aktivierten Kanal bestand in einer stufenweisen Aufreinigung und nachfolgender Rekonstitution des AChR. Zunächst wurde die dem AChR assoziierte periphere 43 K Proteinkomponente durch Alkalibehandlung abgetrennt und gezeigt, daß dieses Molekül keinen signifikanten Einfluß auf die Kanaleigenschaften hat. Dann wurde der AChR affinitätschromatographisch aufgereinigt, in 1,3-SMPC Vesikel überführt und in planare Bilayer rekonstituiert. Es kann nicht völlig ausgeschlossen werden, daß geringe Mengen rezeptorgebundenes, endogenes Lipid mit in die 1,3-SMPC Bilayer gelangte. Es wurde jedoch gezeigt, daß in diesem "angenäherten" Zweikomponentensystem (AChR - 1,3-SMPC) der ACh-akt.-Kanal funktionell rekonstituiert werden kann. Die vorliegenden Ergebnisse stellen die ersten Einzelkanaluntersuchungen mit dem gereinigten AChR dar (118). Darüberhinaus wurden zum ersten Mal quantitative Daten über die Aktivität des AChR in einer definierten Lipidumgebung gewonnen. Es konnte gezeigt werden, daß Rezeptormonomere (119) zur Erklärung der vorliegenden Effekte ausreichen und daß diese die Liganden-bindungsstelle und den Kanal beinhalten müssen. Die Lipidumgebung besitzt keinen direkten fundamentalen Einfluß auf die Aktivität des AChR, solange sich die nicht unmittelbar an den Rezeptor angrenzenden Lipide in einem immobilen physikalischen Zustand befinden.

Nach der Untersuchung des aus "in vivo"-Messungen bekannten ACh-akt.-Kanals wurde eine Präparation untersucht, in der aufgrund von elektrophysiologischen Vielkanalmessungen die Existenz eines Ca^{++}-Kanals postuliert wurde. Es handelt sich um Fragmente der Cilienmembran von Paramecien, die wegen ihrer geringen räumlichen Größe Einzelkanalmessungen mit der Patch-Clamp-Technik nicht zugänglich ist. Bei der Untersuchung dieses Systems wurde festgestellt, daß die Cilienmembran zwei Klassen von Kanälen zu enthalten scheint: erstens einen langsamen, relativ unspezifischen kationischen Kanal und zweitens einen schnellen Ca^{++}-spezifischen Kanal. Der kationische Kanal wurde auch in den Cilienfragmenten einer Pawn-Mutante gefunden. Diese Cilienvesikel zeigten bei Ca^{++}-Flußmessungen mit Arsenazo III einen verminderten Ca^{++}-Einstrom (84). Im Bilayersystem zeigte der kationische Kanal aus der Pawn-Mutante eine wesentlich schnellere Kinetik als der des Wildtyps, jedoch blieb der Leitwert unverändert. Es konnte gezeigt werden, daß der kationische Kanal in seiner Lebensdauer Ca^{++}-abhängig ist, während der Kanalleitwert von Ca^{++} nicht beeinflußt wird. Der kationische Kanal konnte quantitativ in mittlerer Lebensdauer, Leitwert und Ca^{++}-Abhängigkeit charakterisiert werden, während beim Ca^{++}-Kanal in ersten Messungen nur qualitativ die Existenz eines hochselektiven Ca^{++}-Kanals und dies auch nur für die Wildtyp-Vesikel gezeigt werden konnte. Die gefundenen Daten widersprechen nicht den elektrophysiologischen Messungen (12o), auch wenn berücksichtigt werden muß, daß die Salzkonzentration unter physiologischen Bedingungen um 1 bis 2 Größenordnungen geringer als in den vorliegenden Experimenten ist.

4.3 Auswirkungen der Ergebnisse

4.3.1 Rekonstitution biologischer Kanäle

Es wurde eine neue Methode zur Rekonstitution biologischer Kanalproteine in planare Lipidmembranen entwickelt. Dabei werden Protein-enthaltende Vesikel mit planaren Bilayern unterhalb der Phasenumwandlungstemperatur des membranbildenden Lipids fusioniert. Bei dieser Methode, wie auch bei den entsprechenden Fusionsvorgängen zwischen Vesikeln (3o - 33) und Vesikeln mit planaren Membranen, die negative Lipide enthalten (34,35), wird davon ausgegangen, daß die Membranen Störstellen enthalten müssen, die die Fusion ermöglichen. Im Fall eines einkomponentigen Bilayers bei $T \lesssim T_c$ können diese Störstellen folgendermaßen zustande kommen: einmal durch das Auftreten von Phasengrenzen beim Erstarren der Membran im Bereich des Zweiphasengebietes, zum anderen durch Fehler in der kristallinen Anordnung der Lipidmoleküle. Mit Hilfe von elektronenmikroskopischen Gefrierbruchaufnahmen konnte man zeigen, daß Vesikel unter bestimmten experimentellen Bedingungen solche Kristallationsfehler wie z.B. Stufenversetzungen etc. aufweisen (121). Man könnte sich die Fusion eines Vesikels, das Proteine enthält, mit einem planaren Bilayer bei $T < T_c$ wie in Bild 4.1 gezeigt vorstellen.

Die vorgestellte Methode zum Einbau biologischer Kanalproteine in planare Bilayer bei $T \lesssim T_c$ weist folgende Vorteile auf:

1. Es liegt von der Membranseite her im Gegensatz zu anderen Rekonstitutionsmethoden (34,35,116) ein auch theoretisch beschreibbares Einkomponentensystem vor.
2. Das System ist bei Verwendung der Montal-Technik (98) zur Bilayerherstellung "quasi" lösungsmittelfrei.

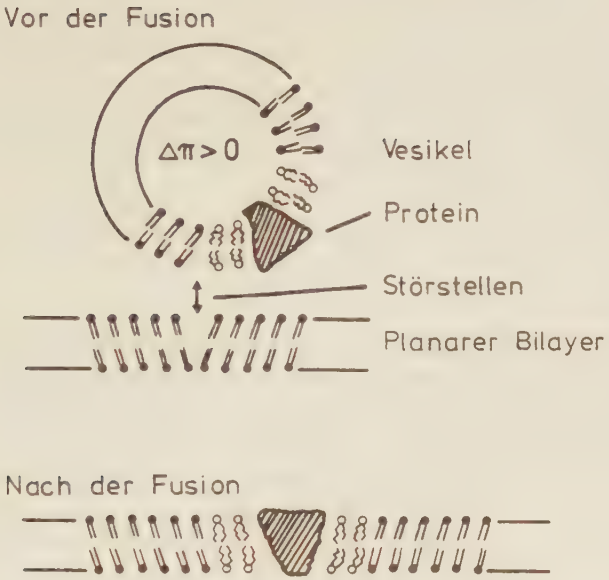


Bild 4.1

Schematische Darstellung der Fusion eines proteinbeladenen Vesikels mit einem planaren Bilayer bei $T < T_c$. Das Vesikelinnere ist hyperosmotisch bezüglich der umgebenden Lösung. Das Lipid des planaren Bilayers befindet sich im kristallinen Zustand und weist Störstellen auf, an denen die Fusion erfolgen kann. Das Lipid in der direkten Umgebung des Proteins befindet sich vor und nach der Fusion wahrscheinlich im flüssigen Zustand.

Dies gilt ebenso bei Anwendung der Techniken von Verger und Pattus (1o2) und der von Schindler (99). Bei entsprechendem Aufwand kann wahrscheinlich ein wirklich lösungsmittelfreies System erreicht werden.

3. Die Proteine kommen nicht mit der Grenzfläche Wasser--Luft in Berührung, was zu Denaturierung des Proteins führen kann. Dies ist der eigentliche Vorteil der hier entwickelten Methode gegenüber der von Schindler beschriebenen (116).

4. Negativ geladene Lipide und Ca^{++} sind bei der Fusion von Vesikeln bei $T \lesssim T_c$ zur Erzeugung von Störstellen nicht erforderlich (3o,31,34,35).

Eine quantitative Untersuchung der Fusionsraten in Abhängigkeit von den äußeren Parametern wie Temperatur, osmotischer Gradient, Lipid etc. ebenso wie eine Kombination der verschiedenen Rekonstitutionsmethoden könnte weitere Verbesserungen auf dem Wege zur Charakterisierung biologischer, biochemisch reiner Kanalproteine bringen.

4.3.2 Modellvorstellungen zum Aufbau biologischer Membranen

Aus den im Rahmen dieser Arbeit gefundenen Ergebnissen ergeben sich einige mögliche Schlußfolgerungen für den Aufbau biologischer Membranen. So konnte gezeigt werden, daß biologische Kanalbildner gerade in kristallinen Membranen ihre Funktion beibehalten. Es muß also die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, daß biologische Membranen zumindest kristalline Bereich enthalten können. Diese These wird durch die bekannt heterogene Zusammensetzung des Lipids biologischer Membranen gestützt. Da die Kinetik identischer Kanäle im flüssigen und kristal-

linen Bereich sehr unterschiedlich ist, diese Bereiche aber in einer Membran koexistieren können, muß gefragt werden, inwieweit es sich bei in biologischen Membranen gefundenen vergleichbaren Kanälen unterschiedlicher Kinetik um identische Proteine handelt, deren Eigenschaften durch die physikalische Beschaffenheit des sie umgebenden Lipids bestimmt werden. Dabei soll nicht außer Betracht gelassen werden, daß Proteine das sie umgebende Lipid weitgehend beeinflussen können und in kristallinen Membranen sich ihre eigene flüssige lokale Lipidumgebung schaffen, was evtl. auch ihre Funktion in diesem Bereich erst möglich macht.

In Bild 1.2 wird eine Membran gezeigt, in der die Lipide in der Umgebung der Proteine aufgrund elektrostatischer Wechselwirkungen im festen Zustand sind, während die übrige Membran fluid ist. Sackmann et al. (122,123) zeigten, daß in Vesikeln, die negativ geladene Lipide enthalten, Phasentrennungen (Domänenstruktur) durch positive Ladungen (Ca^{++} oder Polylysin) in der Badlösung hervorgerufen werden können, wobei die Clusterung durch elektrostatische Wechselwirkung zu kristallinen Bereichen in ansonsten fluiden Vesikeln führt.

Aufgrund der hier präsentierten Ergebnisse und der aus (117) scheint jedoch auch der oben genannte entgegengesetzte Fall möglich zu sein.

5. Zusammenfassung

1. Eine Methode zur Herstellung membrantragender Bohrungen für "quasi" lösungsmittelfreie Bilayer nach der Montal-Mueller-Technik und die zu verwendende Elektronik wurden optimiert.

2. Die optimierte experimentelle Apparatur wurde zur Untersuchung einer Reihe neuer Lipide verwendet. Es handelte sich dabei um hochgereinigte, gesättigte, gemischtkettige Lecithine, deren Phasenumwandlungstemperaturen im physiologisch interessanten Bereich von 20°C bis 40°C lagen. Es war möglich, mit diesen Lipiden stabile planare Bilayer bei $T \leq T_c$ herzustellen. Die elektrischen Parameter Membrankapazität und -leitfähigkeit wurden im Bereich der Phasenumwandlung einer reinen Lipidmembran untersucht und analysiert. Vergleichbare Messungen konnten auch mit 1,2-DPPC durchgeführt werden.

3. Der Carrier Valinomycin, der Porenbildner Gramicidin und das spannungsabhängig porenbildende Polypeptid Alamethicin wurden im Bereich der Phasenumwandlungstemperatur des reinen Lipids untersucht. Beim Gramicidin und Alamethicin wurde Übereinstimmung in Vielporen- und Einzelporenmessungen festgestellt. Der Carrier Valinomycin entmischt bei T = 16-17°C in die Lipid-Wasser-Grenzfläche. Gramicidin und Alamethicin bilden auch weit unterhalb T_c noch "normal" schaltende Poren.

4. Es wurde eine neue Methode entwickelt, um proteinhaltige Vesikel mit planaren Bilayern bei $T < T_c$ zu fusionieren.

5. Durch Versuche mit dem Acetylcholinrezeptor aus Torpedo marmorata in verschiedenen Aufreinigungsstufen

konnte gezeigt werden, daß sich der rekonstituierte AChR im planaren Bilayer zumindest qualitativ genauso verhält wie der intakte ACh-akt.-Kanal in der Zellmembran eines Ratten- oder Froschmuskels. Damit ist gezeigt, daß die hier vorgestellte Fusionsmethode geeignet ist, empfindliche integrale Proteine funktionell in planare Bilayer zu rekonstituieren. Als zusätzliches Ergebnis wurde gefunden, daß der AChR nur in einer gefrorenen Lipidmatrix aktivierbar ist.

6. Cilienmembranfragmente von Paramecium tetraurelia (Wildtyp und PawnA-Mutante) wurden nach der Fusionsmethode in Bilayer inkorporiert und Messungen durchgeführt. Es wurden zwei verschiedene Kanäle gefunden und einer davon näher charakterisiert.

6. Anhang

6.1 Gramicidin

Val-Gramicidin A ist ein lineares Pentadecapeptid, das aus einer Bakterienkultur von Bacillus brevis isoliert wird. Es besitzt folgende Primärstruktur:

```
       1  2     3     4     5     6     7     8
HCO-L-Val-Gly-L-Ala-D-Leu-L-Ala-D-Val-L-Val-D-Val-L-
-Tryp-D-Leu-L-Tryp-D-Leu-L-Tryp-D-Leu-L-Tryp-NHCH2CHOH
  9     1o    11    12    13    14    15
```

In den Analoga Gramicidin B und C ist L-Tryptophan in Position 11 durch L-Phenylalanin bzw. L-Tyrosin ersetzt (42). Beim Gramicidin A sind die Endgruppen blockiert und es besteht mit Ausnahme des Glycins in Position 2 ausschließlich aus hydrophoben Aminosäuren. Die Aminosäuren sind alternierend in D-L-Konfiguration angeordnet. Gibt man Gramicidin in planare Bilayer, so bildet es dort für einwertige Kationen permeable Poren aus (Bild 6.1). Diese Poren entstehen, indem zwei Monomere, die in der Membran lateral diffundieren, durch Assoziation membranüberspannende Poren bilden (Bild 1.5a). Dabei liegen die Carbonylgruppen des Peptidgerüsts in der Innenwand der Poren und die hydrophoben Seitengruppen der Aminosäuren an der Außenseite. Dieses hydrophobe Äußere ist der hydrophoben Lipidmatrix zugewandt, während das Poreninnere durch die Carbonylgruppen einen hydrophilen Charakter bekommt, also den Durchtritt von Ionen ermöglicht. Der Durchmesser des Porenlumens beträgt etwa 4 Å, die Länge der Pore etwa 25-3o Å.

Die Dimerisierung kommt nach Urry (43) durch eine Kopf-an-Kopf-Anlagerung zweier Gramicidin Monomere infolge des Ausbildens von Wasserstoffbrückenbindungen im Bereich der Formylgruppe zustande. Dieser Vorgang läßt sich

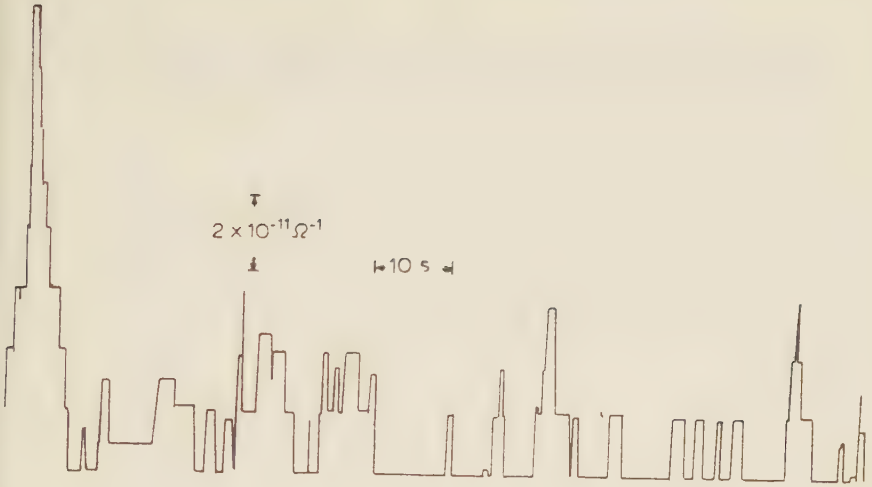


Bild 6.1

Darstellung des Auftretens von Gramicidinporen in einer mit geringen Mengen Gramicidin (10^{-12} M)-dotierten Lipidmembran. Bei der Folge von sprunghaften Stromänderungen handelt es sich um statistisch unabhängige Ereignisse. (aus (44))

durch folgende Reaktionsgleichung beschreiben:

$$A + A \underset{k_D}{\overset{k_R}{\rightleftharpoons}} A_2$$

A: Gramicidinmonomer

A_2: Gramicidindimer

k_R, k_D: Geschwindigkeitskonstanten der Hin-bzw. Rückreaktion

Der Leitwert und die mittlere Lebensdauer von Gramicidin-Poren in 1 M KCl und Dioleoyllecithinmembranen betragen bei 25°C (45)

$$\tau = 0{,}5 \text{ s}$$

$$\Lambda = 20 \text{ pS}$$

6.2 Alamethicin

Alamethicin ist der bestuntersuchte spannungsabhängige Porenbildner in planaren Bilayern. Es wird aus Kulturen des Fadenpilzes Trichoderma viride gewonnen und die als AL-3o bezeichnete Hauptkomponente besitzt die Primärstruktur

```
    1   2   3   4   5   6   7   8   9  1o  11  12
Ac-Aib-Pro-Aib-Ala-Aib-Ala-Gln-Aib-Val-Aib-Gly-Leu-
-Aib-Pro-Val-Aib-Aib-Glu-Gln-Pheol
 13  14  15  16  17  18  19   2o
```

Es handelt sich hierbei sämtlich um L-Aminosäuren.
Die Porenbildung erfolgt über die Aggregation von mehreren,die gesamte Membran überspannenden Molekülen, wodurch Poren variablen Durchmessers entstehen (Bild 6.2 und 1.5 d,'barrel-stave-model'). Dotiert man einen planaren Bilayer mit Alamethicin, so findet man Stromfluktuationen mit verschiedenen Niveaus, die nicht ganzzahlige Vielfache voneinander sind. Diese Niveaus sind den verschiedenen Durchmessern der Pore zuzuordnen. Bild 6.3 a,b zeigt typische Alamethicinfluktuationen. Mit Hilfe der verbesserten Meßelektronik ist es gelungen, den niedrigsten Leitwertzustand der Alamethicinpore aufzulösen (Bild 6.4). Die Spannungsabhängigkeit der Alamethicin-Porenbildung zeigt sich in der Strom-Spannungskennlinie eines dotierten Bilayers (Bild 6.5). Die entsprechende Leitfähigkeit läßt sich beschreiben durch:

$$\lambda = C_{Salz}^{\alpha} \; C_{Al}^{\beta} \exp(\gamma eU/kT)$$

wobei α, β und γ Konstanten sind, für die verschiedene Sätze von Werten gefunden wurden (56).
Über Einzelporenmessungen und Untersuchungen der Strom-Spannungskennlinie hinaus sind Spannungssprung-Stromrelaxationsmessungen und Rauschmessungen durchgeführt worden, deren Ergebnisse mit den Einzelkanalmessungen korrelierbar sind (52,53).

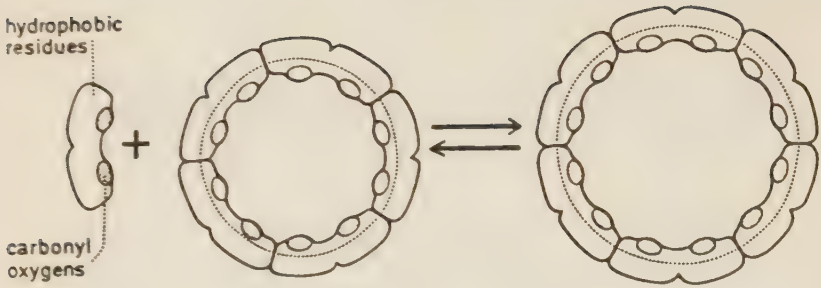


Bild 6.2

Vorgeschlagener Mechanismus einer Pore variablen Durchmessers aus Alamethicinmolekülen: das Fassdaubenmodell. Die Membranebene liegt parallel zur Zeichenfläche, jedes Alamethicinmolekül überspannt die gesamte Membrandicke. Die Veränderung der Porenfläche beim Ein- oder Ausbau eines Moleküls führt zu definierten Leitwertveränderungen der Pore, die die in Bild 6.3 gezeigte Folge nicht ganzzahliger Stufen im Fluktuationsbild zur Folge hat. (aus (50))

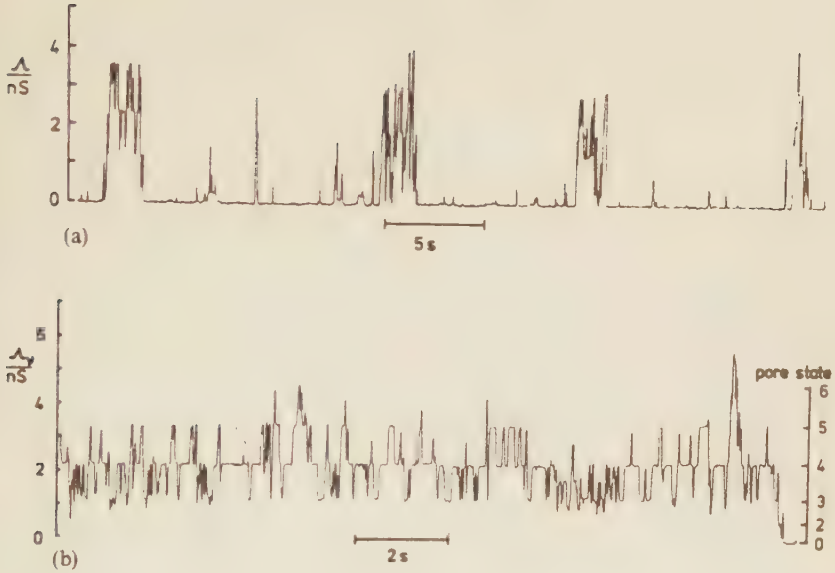


Bild 6.3

Stromfluktuationen eines mit Alamethicin dotierten planaren Bilayers a) Folge einzelner Poren, b) Niveaufluktuationen innerhalb einer Pore. (aus(53))

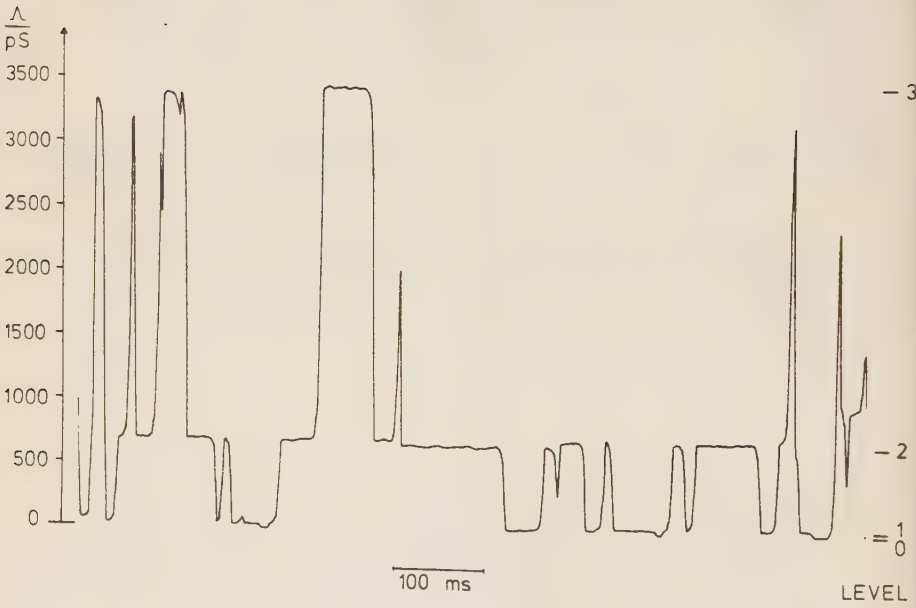


Bild 6.4

Der niedrigste leitende Zustand (Niveau 1) der Alamethicin-Pore. (aus (54))

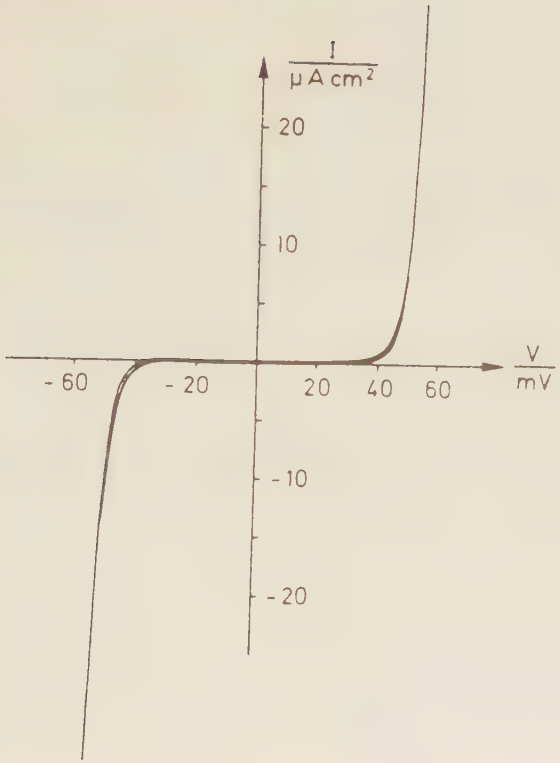


Bild 6.5

Strom-Spannungs-Kennlinie eines mit Alamethicin dotierten planaren Bilayers. (aus (55))

6.3 Der durch Acetylcholin aktivierbare Kanal

Einzelne Ionenkanäle können in biologischen Membranen mit der Methode des extrazellulären 'Patch-Clamp' durch elektrische Isolation einer sehr kleinen Membranfläche an der Spitze einer aufgesetzten Glaspipette gemessen werden (66, 67). Diese Methode wurde zu intensiven Studien des durch Acetylcholin aktivierbaren Kanals (ACh-akt.-Kanal) in der Zellmembran von denervierten Frosch- und Rattenmuskeln sowie in kultivierten Zellen verwendet (68,71,72). Es gelang eine eingehende Charakterisierung dieser Kanäle in Abhängigkeit von verschiedenen Parametern. Insbesondere wurde die Möglichkeit einer Pharmakologie des Einzelkanals aufgezeigt. Bild 6.6 zeigt die Agonistenspezifität der Kanalparameter Leitwert und Lebensdauer. Der Kanalleitwert bleibt unverändert, während die mittlere Lebensdauer agonistenabhängig ist. Eine weitere Eigenschaft des ACh--akt.-Kanals ist seine Blockierbarkeit durch Lokalanesthetica. Dieser Effekt wurde an einzelnen Kanälen von Neher und Steinbach (73) am Beispiel des Lidocainderivats QX-222 untersucht. Bild 6.7 zeigt den Effekt steigender QX -222-Konzentration auf die Schaltkinetik einzelner Kanäle unter Verwendung von Suberyldicholin als Agonisten. Die mit der Patch-Clamp-Technik gemessenen Daten stimmen gut mit den Ergebnissen überein, die schon vorher aufgrund von Voltage--Clamp-Versuchen und Rauschmessungen angegeben wurden (65).

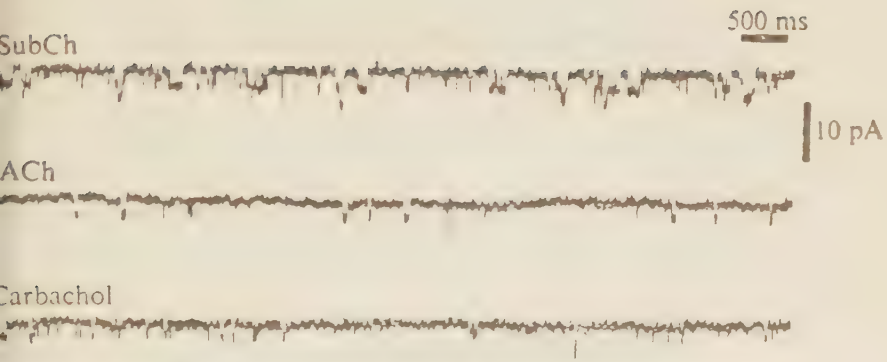


Bild 6.6

Durch Acetylcholin aktivierbare Kanäle in Membranen von denervierten Froschmuskeln. Abhängigkeit der Kanaleigenschaften vom verwendeten Agonisten: Der Leitwert bleibt unverändert, während die mittlere Lebensdauer agonistenabhängig ist.

τ_{SUB} = 45 ms, τ_{ACh} = 26 ms, τ_{Carb} = 11 ms.

Membranspannung: -120 mV, Temperatur: 8°C

(aus (67))

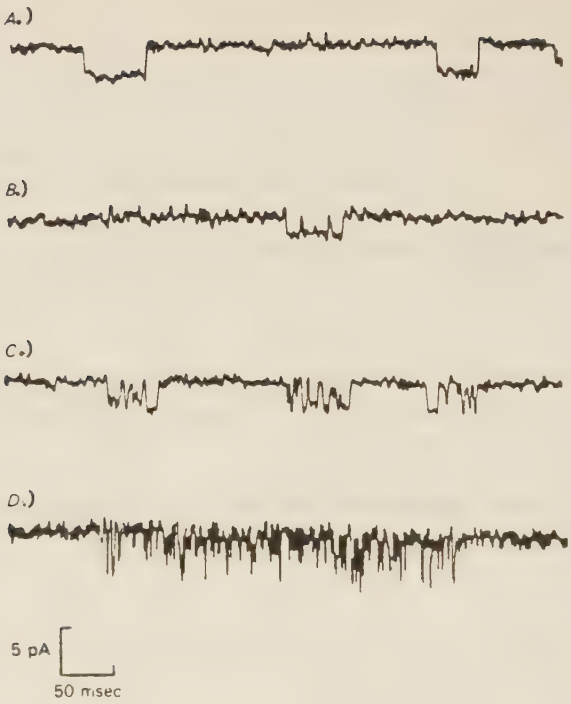


Bild 6.7

Effekt von QX-222 auf offene,durch Acetylcholin aktivierbare Kanäle in Membranen von denervierten Froschmuskeln. Agonist: Suberyldicholin in einer Konzentration von o,1 µM in allen Fällen.

QX-222 Konzentration: a) = 0 µM, b) = 5 µM, c) = 1o µM
d) = 5o µM

Bei zunehmender QX-222 Konzentration treten immer häufiger kurze Kanalblockierungen auf, bis bei d) die Kanalöffnung nur noch als lange Folge von nicht auflösbaren Spikes erscheint. (aus (73))

6.4 Der Ca^{++}-Kanal in der Cilienmembran von Paramecien

Das Verhalten von Paramecien zeichnet sich aus durch eine charakteristische Fluchtreaktion (79). Auf einen Reiz am Vorderende hin schwimmen sie durch Cilienschlagumkehr rückwärts vom Ort des Reizes weg, um anschließend nach einer Taumelperiode in anderer Richtung wieder vorwärts zu schwimmen. Die Richtungsumkehr des Cilienschlages ist korreliert mit einem Anstieg der inneren Ca^{++}-Konzentration aufgrund eines Ca/K-Aktionspotentials (8o). Der Ca^{++}-Einwärtsstrom erfolgt hierbei über spannungsabhängige Ca^{++}-Kanäle in den Cilienmembranen (81). Elektrophysiologisch bestehen die Möglichkeiten, diese Ca^{++}-Kanäle entweder in Differenzmessungen zwischen unbehandelten und deciliierten Paramecien zu studieren (81) oder aber durch Differenzmessungen mit Wildtyp und Defektmutanten. Kung et al. (82,83) war es gelungen, Mutanten zu isolieren, die sich im Verhalten vom Wildtyp unterscheiden, indem die Fluchtreaktion nicht oder nur eingeschränkt ausgeführt wird.

Einen großen Fortschritt im Hinblick auf biochemisches Arbeiten brachte das Verfahren, isolierte Mutanten in großen Mengen auf axenischem Medium zu züchten und über Deciliierung größere Mengen reiner Cilienmembranfragmente herzustellen (84). Mit diesen Vesikeln konnten direkt Messungen des Ca^{++}-Einwärtsstromes mit Hilfe von Arsenazo III als Indikator durchgeführt werden(84), die zeigten, daß die Vesikel Ca^{++}-Kanäle enthalten. Bild 6.8 zeigt das Ergebnis einer solchen Messung. Es werden der Ca^{++}-Einstrom in Cilienmembranvesikeln von Wildtyp und Mutanten (Pawn A d4-94 und Pawn A/Pawn B) verglichen. Die experimentellen Daten zeigen, daß die Cilienmembranvesikel einen Ca^{++}-Kanal enthalten müssen, und zwar in geringerer Anzahl bei den Mutanten als beim Wildtyp. In flüssigem Stickstoff gelagerte Vesikel verhalten sich vergleichbar, jedoch liegt der Endwert des eingeströmten Ca^{++} in allen Fällen etwas geringer.

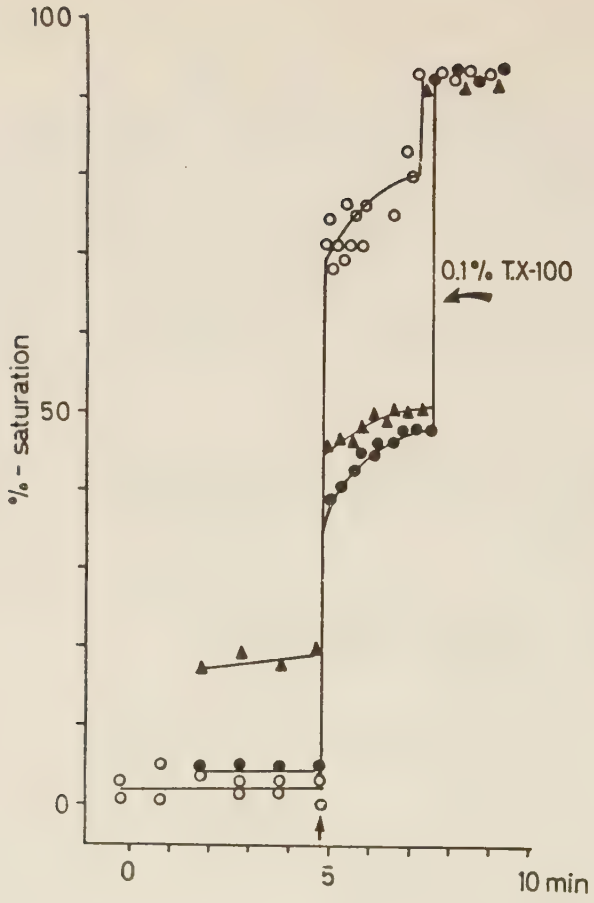


Bild 6.8

Ca^{++}-Einstrom in Cilienmembranvesikel, gemessen durch die Absorption von Arsenazo III.

O-Wildtyp, ▲-PawnA (d4-94), ●-PawnA/PawnB

Bei t=5 min wird 5o µM Ca^{++} (Endkonzentration an freiem Ca^{++}) in die Lösung gegeben und der Ca^{++}-Einstrom in %-Sättigung der Absorption des Arsenazo II gemessen. 1oo% Sättigung entsprechen einem Einstrom von 15 nmol Ca^{++}/mg Protein. Am Schluß wird zur Kontrolle TritonX-1oo zugegeben. Dies erzeugt Lecks in den Vesikeln und führt zum Ca^{++}-Einstrom bis zur 1oo%-Sättigung. (aus (84))

LITERATURVERZEICHNIS:

1) Hodgkin, A.L. and Huxley, A.F. (1952)
J. Physiol. Lond. 224, 665

2) Gorter, E. and Grendel, F. (1925)
J. Ex. Med. 41, 439

3) Danielli, J.F. and Davson, H.A. (1935)
J. comp. Physiol. 5, 495

4) Robertson, J.D. (1957)
J. biophys. biochem. Cytol. 3, 1o43

5) Höfer, M. (1977)
Transport durch biologische Membranen
Verlag Chemie, Weinheim, New York

6) Singer, S.J. and Nicolson, G.L. (1972)
Science 175, 72o

7) Sackmann, E. (1977)
in: Hoppe, N., Lohmann, W., Markel, H. und Ziegler, H., eds.
Biophysik, Springer, Berlin, Heidelberg, New York

8) Mueller, P., Rudin, D.O., Tien, H.T. and Wescot, W.L. (1962)
Nature 194 979

9) Parsegian, A. (1969)
Nature 221, 844

1o) Christie, W.W. (1973)
Lipid Analysis, Pergamon Press, Oxford

11) Chapman, D., Urbino, J. and Keough, K.M. (1974)
J. Biol. Chem. 249 2512

12) Langmeier, I. (1917)
J. Am. Chem. Soc. 39 1848

13) Gaines, Jr., G.L. (1966)
Insoluble Monolayers Interscience Publishers, New York

14) Chapman, D. (1975)
Quat. Rev. Biophys. 8 185

15) Träuble, H. (1971)
Naturwiss. 58 227

16) Overath, P. and Träuble, H. (1973)
Biochemistry 12 2625

17) Engelman , D.M. (1971)
J. Mol. Biol. 58 277

18) Seelig, J. (1977)
Quart. Rev. Biophys. 1o 353

19) Seelig, J. (1978)
Biochim. Biophys. Acta 5o5 1o5

2o) Seelig, J. (1978)
Progr. Colloid and Polymer Sci. 65 172

21) Jähnig, F. (1975)
Habilitationsschrift, Göttingen

22) Krasne, S., Eisenman, G. and Szabo, G. (1971)
Science 174 412

23) Ceccarelli, B., Meldolesi, J. and Clementi (1974)
F. eds.
Cytopharmacology of Secretion, Vol. 2 of Advances in Cytopharmacology, Raven Press, New York

24) Poste, G. and Allison, A.C. (1973)
Biochem. Biophys. Acta 3oo 421

25) Poste, G. (197o)
Adv. Virus Res. 16 3o3

26) Poste, G. (197o)
Microbios. 2 227

27) Ringerts, N.R. and Savage, R.E. (1976)
Cell Hybrids, Academic Press, New York

28) Carlson, P.S. and Polacco, J.C. (1975)
Science 188 622

29) Poste, G. and Papahadjopoulos, D. (1976)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73 1603

30) Papahadjopoulos, D., Vail, N.J., Pangborn, W.A. and Poste, G. (1976)
Biochim. Biophys. Acta 448 265

31) Papahadjopoulos, D., Vail, N.J., Newton, G. Nir, S., Poste, G. and Lazo, R. (1977)
Biochim. Biophys. Acta 465 579

32) Lawaczek, R., Kainosho, M., Giradet, J.-L. and Chan, S.I. (1975)
Nature 256 584

33) Papahadjopoulos, D., Hui, S., Vail, W.J. and Poste, G. (1976)
Biochim. Biophys. Acta 448 215

34) Miller, C. (1978)
J. Membrane Biol. 40 1

35) Cohen, F.S., Zimmerberg, G. and Finkelstein, A. (1980)
J. Gen. Physiol. 75 251

36) Träuble, H. and Eibl, H. (1974)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71 214

37) Bamberg, E., Benz, R., Läuger, P. and Stark, G. (1974)
Chemie in unserer Zeit 2 33

38) Läuger, P. (1972)
Science 178 24

39) Szabo, G., Eisenman, G. and Ciani, S. (1969)
J. Membr. Biol. 43 367

4o) Benz, R. (1978)
J. Membr. Biol. 43 367

41) Haydon, D.A. and Hladky, S.B. (1972)
Quat. Rev. Biophys. 5 187

42) Bamberg, E., Noda, H., Gross, E. and Läuger, P. (1976)
Biochim. Biophys. Acta 419 223

43) Urry, D. (1971)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 68 672

44) Hladky,S.B. and Haydon, D.A. (1974)
Biochim. Biophys. Acta 274 294

45) Bamberg, E. and Läuger, P. (1974)
Biochim. Biophys. Acta 367 127

46) Muller, R.U. and Finkelstein, A. (1972)
J. Gen. Physiol. 6o 263

47) Mueller, P. and Rudin, D.O. (1968)
J. Theor. Biol. 4 268

48) Mueller, P. and Rudin, D.O. (1968)
Nature 217 713

49) Gordon, L.G.M. and Haydon, D.A. (1972)
Biochim. Biophys. Acta 255 1o14

5o) Boheim, G. (1974)
J. Membrane Biol. 19 227

51) Gordon, L.G.M. and Haydon, D.A. (1975)
Phil. Trans. R. Soc. Lond. B27o 433

52) Boheim, G. and Kolb, H.A. (1978)
J. Membrane Biol. 38 99

53) Kolb, H.A. and Boheim, G. (1978)
J. Membrane Biol. 38 151

54) Hanke, W. and Boheim, G. (198o)
Biochim. Biophys. Acta 596 456

55) Boheim, G., Kolb, H.-A., Bamberg, E.,
Apell, H.-J., Alpes , H. and Läuger, P.
in
Electrical Phenomena at Biological Membrane
Level, Roux, E. ed. Elsevier Scient. Publ.
Amsterdam 289-3o8

56) Latorre, R. and Alvarez, O. (1981)
Phys. Rev. 61 77

57) Jung, G., König, W.A., Leibfritz, D., (1976)
Ooka, T., Janko, K. and Boheim, G.
Biochim. Biophys. Acta 433 164

58) Boheim, G., Janko,K., Leibfritz, D. (1976)
Ooka, T., König, W.A. and Jung, G.
Biochim. Biophys. Acta 433 182

59) Irmscher, G., Bovermann, G., Boheim, G. (1978)
and Jung, G.
Biochim. Biophys. Acta 5o7 47o

6o) Boheim, G., Irmscher, G. and Jung, G. (1978)
Biochim. Biophys. Acta 5o7 485

61) Sakmann, B. and Boheim, G. (1979)
Nature 282 336

62) Cahalan, M.D. and Hall, J.E. (1979)
Biophys. J. 25 139 a

63) Mueller, P. (1979)
Brain Res. Bull. Vol. 4 176

64) Conti, F. and Wanke, E. (1975)
Quat. Rev. Biophys. 8 451

65) Neher, E. and Stevens, C.F. (1977)
Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 6 345

66) Neher, E., Sakmann, B. and Steinbach, J.H. (1978)
Pflügers Arch. 375 219

67) Neher, E. and Sakmann, B. (1976)
Nature 26o 799

68) Neher, E. (198o)
Habilitationsschrift, Göttingen

69) Sigworth, F.J. and Neher, E. (198o)
Nature 287 447

7o) Conti, F. and Neher, E. (198o)
Nature 285 14o

71) Hamill, O. and Sakmann, B. (1981)
J. Physiol. in press

72) Sakmann, B., Patlak, J. and Neher, E. (198o)
Nature 286 71

73) Neher, E. and Steinbach, J.H. (1978)
J. Physiol. 277 153

74) Stevens, C.F. (1975)
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.
4o 169

75) Changeux, J.-P. (1981)
The Acetylcholine Receptor: An "Allosteric" Membrane Protein, The Harvey Lectures, in press

76) Briley, M.S. and Changeux, J.-P. (1977)
Int. Rev. Neurobiol. 2o 31

77) Kasai, M. and Changeux, J.-P. (1971)
J. Membrane Biol. 6 1

78) Schindler, H. and Rosenbusch, J.P. (1978)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75 3751

79) Machemer, H. and Peyer de J. (1977)
Verh. Dtsch. Zool. Ges. 86

8o) Naitoh, Y. and Eckert, R. (1968)
Z. vergl. Physiol. 61 427

81) Machemer, H. and Ogura, A. (1979)
J. Physiol. (London) 296 49

82) Chang, S.-Y., van Houten, J., Robbs, L.J. (1974)
and Kung, C.
Genet. Res. 23 165

83) Kung, C., Chang, S.-Y., Satow, Y. (1975)
van Houten, J. and Hansma, H.
Science 188 898

84) Thiele, J. and Schultz, J.E. (1981)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA in press

85) Eibl, H. (198o)
Chem. Phys. Lipids 26 339

86) Chapman, D., Cornell, B.A., Eliaz, A.V. (1977)
and Perry, A.
J. Mol. Biol. 113 517

87) Fromherz, P. (1975)
Rev. Sci. Intrum. 46 138o

88) Wilhelmy, L. (1863)
Ann. Physik 119 177

89) Barrantes, F.J. (1978)
J. Mol. Biol. 124 1

9o) Fels, G., Wolff, E. and Maelicke, A. (1981)
Eur. J. Biochem. in press

91) Barrantes, F.J., Neugebauer, D.-Ch. and Zingsheim, H.P. FEBS Lett. 112 73 (1980)

92) Rüchel, R., Watters, D. and Maelicke, A. Eur. J. Biochem. in press (1981)

93) Maelicke, A., Fulpius, B.W., Klett, R.P. and Reich, E. J. Biol. Chem. 252 4811 (1977)

94) Thiele, J., Honer-Schmid, O., Wahl, J., Kleefeld, G. and Schultz, J.E. J. Protozool. 27 118 (1980)

95) Gibbons, J.R. Arch. Biol. (Liège) 76 317 (1965)

96) Kaneshiro, E.S., Beischel, L.S., Merkel, S.J. and Rhoads, D.E. J. Protozool. 26 147 (1979)

97) Walter, M.F. and Schultz, J.E. Europ. J. Cell Biol. in press (1981)

98) Montal, M. and Mueller, P. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69 3561 (1972)

99) Schindler, H. and Feher, G. Biophys. J. 16 1109 (1976)

100) Datenblatt Op. Amp. BB 3523

101) Bystron, K. Technische Elektronik I, Carl Hanser, München, Wien (1974)

102) Verger, R. and Pattus, F. Chem. Phys. Lipids 16 285 (1976)

103) Eisenberg, M., Hall, J.E. and Mead, C.A. J. Membrane Biol. 14 143 (1973)

1o4) Lee, L.Y. (1972)
Ann. Rev. Pharmacol. 12 265

1o5) Dunlap, K. (1977)
J. Physiol. 217 119

1o6) Seelig, J. and Seelig, A. (198o)
Quart. Rev. Biophys. 13 19

1o7) Papahadjopoulos, D., Jacobson, K., Nir, S., (1973)
and Isac, T.
Biochim. Biophys. Acta 311 33o

1o8) Marsh, D., Watts, A. and Knowles, P.F. (1976)
Biochemistry 15 357o

1o9) Marčelja, S. and Wolfe, J. (1979)
Biochim. Biophys. Acta 557 24

11o) Antonov, V.F., Petrov, V.V., Molnar, A.A. (198o)
Predvoditelev, D.A. and Ivanov, A.S.
Nature 283 585

111) Schindler, H. (1979)
Biochim. Biophys. Acta 555 316

112) Hsu, M.-C. and Chan, S.I. (1973)
Biochemistry 12 3872

113) Pohl, G.W., Knoll, W., Gisin, B.F.
and Stark, G. (1976)
Biophys. Struct. Mech. 2 119

114) Bamberg, E. and Läuger, P. (1973)
J. Membrane Biol. 11 177

115) Sheridan, R.E. (1976)
Biophys. J. 16 212 a

116) Schindler, J. and Quast, U. (198o)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77 3o52

117) Überschär, S. (1981)
Diplomarbeit, Bochum

118) Nelson, H., Anholt, R., Lindstrom, J. and Montal, M. (198o)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77 3o57

119) Maelicke, A., Fulpius, B.W. and Reich, E. (1977)
Handbook of Physiology, Section 1, Vol. 1
Chap. 14, pp 493
American Physiological Society, Bethesda

12o) Satow, Y. and Kung, C. (198o)
J. exp. Biol. 81 293

121) Gebhardt, G., Gruler, H. and Sackmann, E. (1977)
Z. Naturforsch. 32c 581

122) Galla, H.-J. and Sackmann, E. (1975)
Biochim. Biophys. Acta 4o1 5o9

123) Hartmann, W., Galla, H.-J. and Sackmann, E. (1977)
FEBS Letters 78 169

Wesentliche Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

1. Hanke, W. und Boheim, G.
   Biochim. Biophys. Acta. 596, 456 - 463 (1980)
   The lowest conductance state of the Alamethicin Pore

2. Boheim, G., Hanke, W. und Eibl, H.
   Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 3403-3407 (1980)
   Lipid phase transition in planar bilayer membrane and its effect on carrier- and pore-mediated ion transport

3. Hanke, W. und Boheim, G.
   Biophys. Struct. Mech., im Druck (1981)
   A new method for membrane reconstitution: Fusion of protein-containing vesicles with planar bilayer membranes below lipid phase transition temperature

4. Boheim, G., Hanke, W., Barrantes, F.J.,
   Eibl, H., Sakmann, B., Fels, G. und Maelicke, A.
   Proc. Natl. Acad. Sci. USA, im Druck (1981)
   Agonist-induced ionic channels in acetylcholine receptor reconstituted into planar lipid bilayers

5. Boheim, G., Hanke, W. und Schultz, J.E.
   Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 362, 192 (1981)
   Characterization of a Ca^{2+}-dependent cationic channel from cilia of wild-type and pawn-mutant paramecium by incorporation into planar bilayers
   (Tagungsabstrakt)

Für hilfreiche Unterstützung bei der Fertigstellung meiner Dissertation danke ich
F.J. Barrantes, H. Eibl, G. Fels, G. Jung, A. Maelicke, E. Neher, B. Sakmann, H. Schindler, J.E. Schultz, D. Wefelmeier, J. Zwoyczyk.

Herrn Prof. Dr. H. Ch. Lüttgau und dem Lehrstuhl für Zellphysiologie danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes.

Der DFG danke ich für die Unterstützung durch Sach- und Personalmittel.

Herrn Doz. Dr. G. Boheim danke ich für die interessante Themenstellung und die intensive Betreuung.

Lebenslauf

geboren:	06.05.1951 in Minden, NRW
Eltern:	Heinrich Hanke Gerda Hanke, geb. Albrecht
Schule:	April 1957 bis April 1961 Grundschule Löhne-Bhf. April 1961 bis Juni 1970 Ravensberger Gymnasium, Herford
Abitur:	13.06.1970
Bundeswehr:	01.10.1970 bis 31.09.1972 in Diepholz, Wagenfeld, Iserlohn
Universität:	ab WS 72/73 Grundstudium der Physik und Astronomie, Vordiplom der Physik am 18.10.1974 anschließend Hauptstudium der Physik und Astronomie, am 08.05.1978 Diplom in Physik am Lehrstuhl für experimentelle Plasmaphysik der Ruhr-Universität Bochum bei Herrn Prof. Dr. Wiesemann seit 01.06.1978 wiss. Hilfskraft am Lehrstuhl für Zellphysiologie im SFB 114 Bionach der Ruhr-Universität Bochum bei Herrn Doz. Dr. Boheim seit 01.01.1981 wiss. Angestellter am Lehrstuhl für Zellphysiologie im SFB 114 Bionach der Ruhr-Universität Bochum seit 01.06.1978 Promotion im Fachbereich Biologie der Ruhr-Universität Bochum